

München, 1960

**Über die freien Aminosäuren
in Harn und Punktatflüssigkeiten**

Hans Selmair



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

**Über die freien Aminosäuren
in Harn und Punktatflüssigkeiten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Selmair
aus Wartenberg

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. H. ZICKGRAF
Korreferent: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan: Professor Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1960



Veröffentlichungen:

1. Hoppe-Seylers Zeitschrift für Phys. Chemie 317, 108, 1959
und
2. 318, 73, 1960
3. Klin. Wochenschrift, 85. Jahrgang, 812, 1960

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINFÜHRUNG	7
I. Die Bestimmung der freien Aminosäuren im Harn mit Hilfe eines neuen manometrischen Verfahrens	
1. Einleitung	7
2. Prinzip	8
3. Methodik	9
4. Ergebnisse	
a) Versuche mit Reinsubstanzen	10
b) Bestimmung der Harnaminosäuren	16
5. Diskussion	18
II. Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Harn bei Gesunden und bei Leberkranken	
1. Einleitung	20
2. Auswahl der Fälle	21
3. Methodik	21
4. Ergebnisse	
a) Normalfälle	23
b) Hepatitiden	27
c) Lebercirrhosen	29
d) Weitere Untersuchungsergebnisse	30
5. Diskussion	31
III. Die freien Aminosäuren in Ascites- und Pleura- punktaten	
1. Einleitung	34
2. Methodik	34
3. Durchführung der Versuche	35

	Seite
4. Ergebnisse	
a) Gesamt- α -Aminostickstoff	36
b) Einzelaminosäuren	39
5. Diskussion	42
C. ZUSAMMENFASSUNG	44
D. LITERATURVERZEICHNIS	46

E I N F Ü H R U N G

In Ergänzung anderer in unserer Klinik durchgeführter Arbeiten über die freien Aminosäuren von Liquor cerebrospinalis und Blutplasma haben wir die Untersuchung der Aminosäuren im Harn und in Punktatflüssigkeiten vorgenommen. Zunächst sollte das Spektrum der in diesen Flüssigkeiten konstant vorkommenden freien Aminosäuren mit Hilfe eines qualitativen Trennungsverfahrens analysiert werden. Bei der Untersuchung der Harnaminosäuren waren jedoch ungleich größere methodische Schwierigkeiten zu überwinden, als bei Liquor cerebrospinalis und Blutplasma. Sie ergaben sich vor allem durch die sehr erhebliche Schwankungsbreite des Aminosäuregehaltes verschiedener Harnportionen, die hohe Harnstoff- und Ammoniakkonzentration und die Gegenwart größerer Mengen von anorganischen Salzen und anderen störenden Substanzen im Harn. Unsere erste Aufgabe war daher die Entwicklung einer leistungsfähigen, von den genannten Faktoren unbeeinflussten, quantitativen Bestimmungsmethode. Sie diene als Grundlage für die nachfolgende qualitative Untersuchung und ermöglichte, die zur Chromatographie verwendete Aminosäuremenge konstant zu halten. Dadurch können Verschiebungen innerhalb des Aminosäurespektrums leichter beurteilt werden.

I. T E I L

Die Bestimmung der freien Aminosäuren im Harn mit Hilfe
eines neuen manometrischen Verfahrens

1. Einleitung

Der Aminostickstoff wird in der Klinik gewöhnlich durch die sehr einfache, jedoch ziemlich ungenaue Formoltitration nach SØRENSEN (1, 2) bestimmt. Für manche Zwecke haben sich kolorimetrische Verfahren, wie das von FOLIN (3, 4), von TROLL und CANNAN (5) oder von STEIN und MOORE (6) bewährt. Da sich hierbei jedoch die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich anfärben, kann bei einer Gesamtaminosäurebestimmung nur dann mit reproduzierbaren Werten gerechnet werden, wenn das Spektrum der zu untersuchenden Aminosäuren sich von Versuch zu Versuch nicht allzusehr ändert. Dies ist bei der Bestimmung der freien Blutaminosäuren einigermaßen gewährleistet (SCHREIER und PLÜCKTHUN, 7, HOFSTATTER, ACKERMANN und KOUNTZ, 8, STEIN und MOORE, 9, KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10), trifft für die Harnaminosäuren jedoch viel weniger zu (STEELE, REYNOLDS und BAUMANN, 11, DENT, 12, WALSHE, 13, DENT und WALSHE, 14). Die wesentlichste Fehlerquelle wird im Harn jedoch

durch den hohen Ammoniak- und Harnstoffgehalt verursacht. Beide Substanzen färben sich ebenfalls mit Ninhydrin. Ihre Konzentration schwankt bei wechselnder Diät und unterschiedlichem p_H -Wert des Harnes erheblich (WERLE, 15) und steht in keinem Zusammenhang mit der Aminosäureausscheidung (LANG und RANKE, 16). Die dadurch bedingten Fehlermöglichkeiten erfordern bei exakten quantitativen Aminosäurebestimmungen die vorherige Entfernung dieser Stoffe (VAN SLYKE, DILLON, MacFADYEN und HAMILTON, 17, HAMILTON und VAN SLYKE, 18). Leider ist dies nicht ganz einfach. Entweder gehen dabei auch Aminosäuren verloren oder die Prozedur wird so aufwändig und zeitraubend, daß die Brauchbarkeit der Methode für größere Versuchsreihen in Frage gestellt ist.

Die gasometrische Aminosäurebestimmung nach van Slyke (VAN SLYKE, DILLON, MacFADYEN und HAMILTON, 17, HAMILTON und VAN SLYKE, 18, VAN SLYKE, MacFADYEN und HAMILTON, 19) erfaßt das CO_2 der Carboxylgruppe. Ammoniak und Harnstoff stören daher nicht. Ein solches Verfahren ist demnach gerade für die Bestimmung der Harnaminosäuren besonders geeignet. Jedoch ist auch hier der Aufwand beträchtlich. Wir konnten uns nicht zu seiner Einführung für Routineuntersuchungen entschließen. Kürzlich gaben CHAPELLE und LUCK (20) eine neue gasometrische Bestimmungsmethode an, die auf einem ähnlichen Prinzip beruht und sehr einfach im Warburg-Apparat auch in größeren Versuchsreihen durchgeführt werden kann. Das Verfahren erschien uns wegen seiner Einfachheit und Genauigkeit besonders geeignet und wir haben es deshalb auf seine Anwendbarkeit zur Bestimmung der Harnaminosäuren geprüft.

2. Prinzip

Barakat (BARAKAT und MOUSA, 21, BARAKAT, 22, BARAKAT, EL-WAHAB und EL-SADR, 23) beobachtete 1952, daß bestimmte α -substituierte Carboxylgruppen decarboxyliert werden, wenn man entsprechende Säuren mit einer wässrigen N-Bromsuccinimidlösung zur Reaktion bringt. Diese Reaktion läuft bei Zimmer-temperatur zu Ende ab. Er konnte auf diese Weise Aminosäuren und unter anderen Reaktionsbedingungen auch die endständigen Carboxylgruppen von Peptiden und Proteinen bestimmen. Bei der Reaktion erfolgt eine Entwicklung von CO_2 und Brom. Die CO_2 -Menge ist stöchiometrisch und der Aminosäurekonzentration direkt proportional, während das freigesetzte Brom sowohl aus der Decarboxylierungsreaktion als auch aus dem hydrolytischen Zerfall des in wässriger Lösung nicht ganz beständigen N-Bromsuccinimid stammen kann. Die Hydrolyse von N-Bromsuccinimid kann dadurch verhindert werden, daß man die Reaktion in einem Natriumacetat - Essigsäure - Puffer vom p_H 4,7 ausführt und Succinimid im Überschuß zugibt. Die bei der Decarboxylierungsreaktion freigesetzte CO_2 -Menge wird gemessen, das bei der gasometrischen Bestimmung störende Brom wird durch eine 40%ige Kaliumjodidlösung aufgefangen.

3. Methodik

In den Seitenarm des Reaktionsgefäßes werden zunächst 0,5 ml einer N-Bromsuccinimid-Lösung einpipettiert. Diese wird jeweils frisch bereitet. Man gibt 2,5 g N-Bromsuccinimid und 2,5 g Succinimid zu 25 ml eines 0,2 m Natriumacetat-Essigsäure-Puffers vom p_H 4,7. (Herstellung: 27,25 ml 0,2 m Natriumacetatlösung + 22,75 ml 0,2 m Essigsäure, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen). Wegen der geringen Löslichkeit von N-Bromsuccinimid bleibt der größte Teil des Salzes in Suspension und setzt sich später am Boden ab. Der Überschuß garantiert während der ganzen Reaktionsdauer eine genügende Konzentration des Reagens. In den vom Hauptraum getrennten Innentrog des Warburg-Gefäßes werden 0,5 ml einer 40%igen Kaliumjodidlösung gegeben zur Absorption von freigesetztem Brom. In den Hauptraum kommt die zu untersuchende Lösung, im allgemeinen 1 ml, bei konzentrierteren Lösungen entsprechend weniger. Das Volumen im Hauptgefäß wird dann mit einer 10%igen Succinimidlösung in Natriumazetat-Essigsäure-Puffer (p_H 4,7) auf 3 ml aufgefüllt. Der Überschuß von Succinimid im Hauptgefäß dient zur Stabilisierung von N-Bromsuccinimid, das sonst leicht hydrolytisch gespalten würde (CHAPELLE und LUCK, 20). Das Reaktionsoptimum liegt bei p_H 4,7. Bei einem Wert unter 3 reagiert N-Bromsuccinimid nicht mit Aminosäuren. Bei einem Reaktionsmedium über p_H 5 wird CO_2 zurückgehalten. Bei p_H -Werten über 8 ist N-Bromsuccinimid instabil und zerfällt in Brom und Succinimid (CHAPELLE und LUCK, 20). Die Versuche erfolgen bei einer Temperatur von 30° C. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt zwar mit höheren Temperaturen, jedoch würde dann gleichzeitig die Zerfallsneigung von N-Bromsuccinimid zunehmen.

Nachdem die Warburg-Gefäße ins Wasserbad eingesetzt sind und die Temperatur sich angeglichen hat, werden die Hähne der Manometer geschlossen. Nach 20 Minuten hat sich ein stabiles Gleichgewicht eingestellt. Jetzt kann durch Kippen der N-Bromsuccinimid-Suspension aus dem Seitenarm in das Hauptgefäß die Reaktion in Gang gesetzt werden. Die Manometer werden zunächst alle 5 Minuten, später in längeren zeitlichen Abständen abgelesen. Die letzte Messung erfolgt 3 Stunden nach Beginn des Versuches.

Die Aufbereitung der Harnen ist denkbar einfach: 10 ml werden mit Trichloressigsäure enteiweißt und dann zur Entfernung störender Ketosäuren und überschüssiger Trichloressigsäure wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Anschließend wird der p_H -Wert auf 4,7 gebracht und eine Menge, die 0,25 ml ursprünglichem Harn ent-

Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dr. JUNGBLUT und Herrn Dr. MAYER vom Physiologisch Chemischen Institut der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. BUTENANDT) für wertvolle methodische Ratschläge und Hinweise herzlich danken.

spricht, in die Warburg-Gefäße einpipettiert. Pleura- und Ascitespunktate werden in gleicher Weise behandelt. Wir haben in den hier geschilderten Versuchen die Harnen meist mit gekühltem Aceton enteiweißt. Durch Einengen im Vakuum wurde dann das Aceton entfernt, der Rückstand wurde mit dem vierfachen Volumen $n/10$ HCl aufgenommen, diese Lösung auf p_H 4,7 gebracht und eine entsprechende Menge zur Bestimmung verwandt. Dieses etwas kompliziertere Vorgehen war notwendig, weil die enteiweißten Harnproben gleichzeitig zur Anfertigung zweidimensionaler Hochspannungselektrophore-Chromatogramme dienen sollten und sich hier die Acetonenteiweißung als vorteilhafter erwies. (Durch Aceton wird in der Kälte mit den Eiweißen gleichzeitig ein großer Teil der bei der Chromatographie sehr störenden anorganischen Salze ausgefällt).

4. Ergebnisse

a) Versuche mit Reinsubstanzen

Zunächst wurde die Fehlerbreite des Verfahrens in weiten Konzentrationsbereichen bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Mengen der Aminosäuren Alanin, Arginin, Citrullin, Cystein, Cystin, Glutaminsäure, Glykokoll, Leucin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin eingesetzt und die entwickelten CO_2 -Mengen bestimmt. Für Alanin finden sich die entsprechenden Werte in Tabelle 1.

Tabelle 1: Erklärung siehe Text.

eingesetzte AS-Menge in μMol	abgelesene CO_2 -Menge in μMol	Abweichung v. theoret. zu erwart. Wert	durchschn. wieder- gefund. AS-Menge in μMol
1 μMol	1,02	+ 0,02	0,99 $\pm$ 0,03
	0,97	- 0,03	
	0,98	- 0,02	
2 μMol	2,06	+ 0,06	2,02 $\pm$ 0,06
	1,97	- 0,03	
	2,04	+ 0,04	
3 μMol	2,94	- 0,06	2,97 $\pm$ 0,07
	2,93	- 0,07	
	2,97	- 0,03	
	3,05	+ 0,05	
4 μMol	4,01	+ 0,01	4,03 $\pm$ 0,12
	4,12	+ 0,12	
5 μMol	4,85	- 0,15	4,92 $\pm$ 0,17
	4,95	- 0,05	
	4,85	- 0,15	
	5,11	+ 0,11	
	4,91	- 0,09	
	4,83	- 0,17	
	5,00	$\pm$ 0	
	4,84	- 0,16	
8 μMol	7,93	- 0,07	8,05 $\pm$ 0,17
	8,17	+ 0,17	
10 μMol	9,77	- 0,23	9,71 $\pm$ 0,33
	9,67	- 0,33	
	9,71	- 0,29	
	9,68	- 0,32	

Bei Mengen von 1 bis 10 $\mu\text{Mol/ml}$ erhielten wir eine Streubreite von $\pm$ 2 - 3 %. Abbildung 1 zeigt für Alanin den streng linearen Anstieg der CO_2 -Menge in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Aminosäuremengen und die Fehlerbreite der Bestimmung. Ähnliche Geraden erhielten wir für sämtliche untersuchten Aminosäuren.

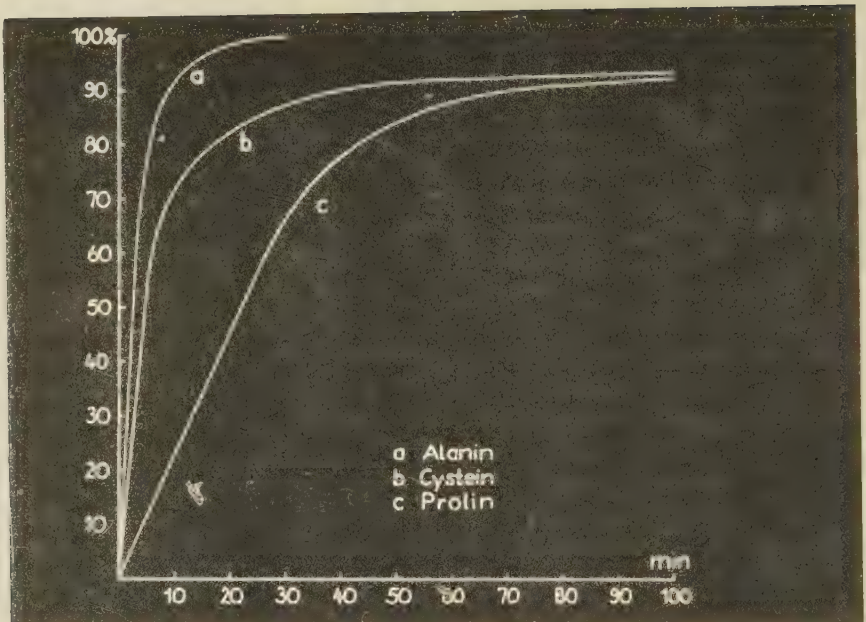


Abbildung 1: Zeigt den linearen Anstieg der am Manometer abgelesenen CO_2 -Menge in μl in Abhängigkeit zur Konzentration der eingesetzten Aminosäuremenge in μMol . Die durchbrochenen Linien zeigen die Streuung der Werte bei insgesamt 26 Bestimmungen.

Der Vergleich der einzelnen Aminosäuren ergab jedoch, daß die Reaktion mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft. Bei Alanin ist bereits nach einer halben Stunde der Höchstwert erreicht. Ähnliches Verhalten beobachteten wir auch bei Arginin, Citrullin, Glutaminsäure, Glykokoll, Leucin, Serin, Threonin, Tryptophan und Valin. Bei Cystein, Cystin, Methionin, Prolin und Tyrosin beträgt die Reaktionsdauer dagegen zwei Stunden und mehr. Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Reaktion bringt Abbildung 2.

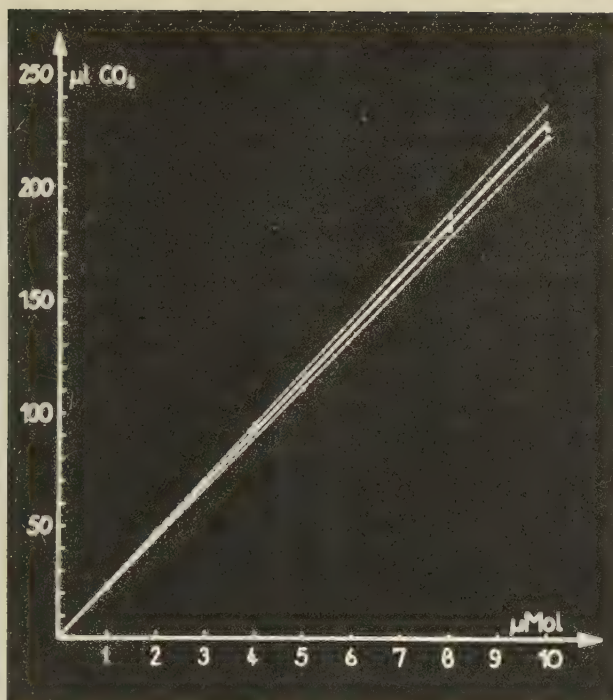


Abbildung 2: Zeigt den zeitlichen Verlauf der Decarboxylierung verschiedener Aminosäuren durch Br-Succinimid bei 30° C. Die meisten übrigen Aminosäuren werden wie Alanin in 30 Min. vollständig decarboxyliert. Ihre Kurven decken sich mit der des Alanins. Cystein und Prolin decarboxylieren etwas langsamer und erreichen auch nach 100 Minuten noch nicht den Endwert.

Bei den Aminosäuren Cystein, Cystin, Methionin und Prolin ist die Reaktion auch nach drei Stunden noch nicht beendet. Bei Cystein waren nach 3 Stunden durchschnittlich $92,5 \pm 4$ % der vorhandenen Carboxylgruppen decarboxyliert, bei Methionin wurden $92,5 \pm 2$ % und bei Prolin $92 \pm 3,5$ % erreicht. Bei Cystin werden beide Carboxylgruppen decarboxyliert. Allerdings ist hier die Reaktion noch unvollständiger. Nach 3 Stunden wurden 120 % der bei anderen Aminosäuren gewohnten CO_2 -Menge abgelesen. Ob dieser Wert dadurch zustande kommt, daß die eine Carboxylgruppe leicht und vollständig, die andere nur sehr schwer decarboxyliert wird oder dadurch, daß beide CO_2 -Gruppen zwar gleichmäßig, aber mit relativ geringer Reaktionsgeschwindigkeit abgespalten werden, können wir nicht entscheiden. In Tabelle 2 finden sich die ermittelten Werte für die genannten Aminosäuren.

Tabelle 2: Erklärung siehe Text.

Aminosäure	einges. AS-Menge in μMol	abgelesene CO_2 -Menge in μMol	Abweichung v. theor. zu erwart. Wert	durchschn. wieder- gefund. AS-Menge in μMol u. Abweichg. v. Mittelwert
Cystein	5 μMol	4,55	- 0,45	4,54 $\pm$ 0,18
		4,60	- 0,40	
		4,41	- 0,59	
		4,65	- 0,35	
		4,51	- 0,49	
		4,72	- 0,28	
		4,40	- 0,60	
		4,45	- 0,55	
	10 μMol	9,61	- 0,39	9,47 $\pm$ 0,14
		9,34	- 0,66	
Cystin	5 μMol	6,10	- 3,90	5,99 $\pm$ 0,16
		5,83	- 4,17	
		6,10	- 3,90	
		5,97	- 4,03	
		6,02	- 3,98	
		5,90	- 4,10	
Methionin	5 μMol	4,45	- 0,55	4,55 $\pm$ 0,10
		4,64	- 0,36	
	10 μMol	9,09	- 0,91	9,15 $\pm$ 0,06
		9,20	- 0,80	
Prolin	5 μMol	4,68	- 0,32	4,64 $\pm$ 0,19
		4,48	- 0,52	
		4,78	- 0,22	
		4,45	- 0,55	
		4,77	- 0,23	
		4,68	- 0,32	
	10 μMol	8,90	- 1,10	9,11 $\pm$ 0,31
		9,42	- 0,58	
		9,02	- 0,98	

Bei Peptiden und höhermolekularen Verbindungen wie Eiweißen läuft die Reaktion wesentlich langsamer ab als bei freien Aminosäuren (CHAPELLE und LUCK, 20). Die Bestimmung derselben wird durch die Gegenwart dieser höhermolekularen Stoffe daher kaum gestört. Nur bei einigen Aminosäuren, wie Cystin, scheinen sich die Reaktionszeiten etwas zu überschneiden. Wir haben daher die Harnproben jeweils vorher enteiweißt, fanden jedoch keine wesentlichen Unterschiede zu nicht enteiweißtem Harn. Erst nach Zugabe von Palladiumchlorid gelingt es, die Reaktion mit Eiweißen und Peptiden soweit zu beschleunigen, daß auch sie bestimmt werden können. Die Ausfällung von Proteinen kann dabei durch Hinzufügen eines Lösungsvermittlers vermieden werden. Da nur die endständigen CO_2 -Gruppen reagieren, konnte die Reaktion auch zur Molekulargewichtsbestimmung reiner Eiweißkörper herangezogen werden. (CHAPELLE und LUCK, 20). Wir haben die Reaktionsbedingungen dieser Stoffe jedoch nicht nachgeprüft. Sie liegen außerhalb unserer Problemstellung.

Wie bei Einzelaminosäuren, so bestimmten wir auch bei Aminosäuregemischen die Reaktionsbedingungen und die Fehlerbreite der Methode. Bei Einsatz eines die 23 Aminosäuren Alanin, α -Aminobuttersäure, Arginin, Asparagin, Cystein, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin enthaltenden Gemisches lasen wir nach 3 Stunden eine CO_2 -Menge von 96 % des theoretisch errechneten Wertes ab. Die Schwankungsbreite betrug bei mehreren Versuchen in verschiedenen Konzentrationsbereichen ± 2 % vom Mittelwert.

Damit schien uns die Brauchbarkeit der Bestimmungsmethode für reine Aminosäurelösungen ausreichend gesichert. Wir fragten uns nun, ob in biologischen Flüssigkeiten die Spezifität des Verfahrens durch die Gegenwart anderer Substanzen beeinträchtigt wird, die ebenfalls die gleiche Reaktion geben. Theoretisch ist damit zu rechnen, daß nicht nur die CO_2 -Gruppen decarboxyliert werden, die einer Aminogruppe benachbart sind, sondern auch diejenigen, die durch benachbarte Keto- oder Hydroxylgruppen aktiviert werden. In biologischen Flüssigkeiten sind dies vor allem die Keto- und Oxy-säuren. Wir untersuchten daher das Verhalten von Brenztraubensäure, Acetessigsäure, α -Ketoglutar-säure, Milchsäure, Oxalessigsäure und Harnstoff. Bei einigen dieser Substanzen beobachteten wir tatsächlich eine CO_2 -Entwicklung. Im einzelnen fanden wir für Acetessigsäure eine völlige Decarboxylierung. Bei Oxalessigsäure waren nach 3 Stunden 56 % der vorhandenen CO_2 -Gruppen abgespalten, bei Brenztraubensäure 25 %. Bei α -Ketoglutar-säure und Milchsäure wurde keine Gasentwicklung beobachtet, erwartungsgemäß auch nicht beim Harnstoff. Die Anwesenheit bestimmter Keto- und Oxy-säuren in größerer Menge kann daher die Verwendbarkeit der Methode für biologische Flüssigkeiten einschränken, sofern diese nicht durch ein einfaches Verfah-

ren entfernt werden können. Eine Möglichkeit dazu bietet z. B. die im Verhältnis zu den Aminosäuren wesentlich bessere Ätherlöslichkeit dieser Stoffe. Brenztraubensäure und Oxalessigsäure konnten wir durch mehrmaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Äther völlig aus einer wässrigen oder salzsauren Lösung entfernen. Lediglich bei Acetessigsäure gelang das nicht vollständig. Gleichzeitig vorhandene Aminosäuren bleiben dabei quantitativ in der wässrigen Phase.

Wir halten die Spezifität des geschilderten Verfahrens für Aminosäureanalysen in biologischen Flüssigkeiten folglich für ausreichend. Von allen anderen physiologisch vorkommenden Verbindungen, die die gleiche Reaktion geben, verbleibt nach Ätherausschüttelung nur ein Teil der Acetessigsäure zurück. Darin sehen wir keinen erheblichen Störfaktor, da ihre Konzentration im Harn gering ist. Im 24-Stunden-Harn beträgt ihre Menge nur 0,1 bis 1 % der täglich ausgeschiedenen Aminosäuren (LEONARDI und GLASENAPP, 24).

Da sie durch Erhitzen in wässriger Lösung stürmisch zerfällt, könnte sie durch vorheriges Kochen der Harnprobe quantitativ entfernt werden (PRAGER und JACOBSON, 25).

b) Bestimmung der Harnaminosäuren

Nach Klärung dieser Vorfragen wurde das Verfahren zur Bestimmung der Harnaminosäuren herangezogen. Zunächst wurden zu Harnproben mit bekanntem Aminosäuregehalt künstliche Aminosäuregemische in einer Menge von 5 bis 10 $\mu\text{Mol/ml}$ hinzugefügt. Wir verwendeten die Aminosäuren Alanin, Arginin, Glutaminsäure und Valin allein oder in Mischung. In Wiedergewinnungsversuchen wichen die gefundenen Aminosäuremengen um höchstens $\pm 2,5\%$ vom Wert der eingesetzten Aminosäuremenge ab. Es wurden also praktisch dieselben Fehlerbreiten wie mit reinen Lösungen erreicht.

Sodann untersuchten wir eine Serie von 24 Morgenurinen gesunder Versuchspersonen. Diese haben einen wesentlich höheren Gehalt an freien Aminosäuren als 24-Stunden-Urin. Unsere Werte lagen zwischen 15 und 25 $\mu\text{Mol Aminosäuren/ml}$ Harn. Doppelbestimmungen an demselben Harn vor und nach Enteiweißung ergaben keine über die Fehlerbreite hinausgehenden Unterschiede. Bei 24-Stunden-Harnen von 6 gesunden Versuchspersonen erhielten wir die in Tabelle 3 aufgeführten Werte. Sie stimmen gut mit bisher bekannten, mit anderen Methoden gewonnenen Werten der Literatur überein (VAN SLYKE, MacFADYEN und HAMILTON, 26, ALBANESE und IRVY, 27, ECKHARDT und DAVIDSON, 28, STEIN, 29, MÜTING, 30, RUBINSTEIN und PRYCE, 31). Die 8 weiteren in Tabelle 3 angegebenen Werte stammen von drei Patienten mit Morbus Wilson. Die Aminosäuremengen lagen, wie erwartet, merklich über denen gesunder Versuchspersonen. Die Aminoacidurie ist ein lange bekanntes und ziemlich konstantes Symptom der

hepatocerebralen Degeneration (SIEMERLING und OLOFF, 32, UZMAN und DENNY-BROWN, 33, MOORE und STEIN, 34, STEIN, BEARN und MOORE, 35, STEGER und STEGER, 36).

Tabelle 3: Aminosäuremengen im 24-Stunden-Harn bei gesunden Versuchsfällen und bei 3 Fällen von Morbus Wilson.

Versuchsperson	gefundene Aminosre- menge in $\mu\text{Mol/ml}$ Harn	Harnmenge in ml/24 h	Gesamtaminosre- Ausscheidung in mMol/24 h
A. D.	10,11	700	7,07
K. G.	11,59	520	6,02
L. S.	7,56	1 300	9,82
G. St.	3,81	1 800	6,85
M. W.	5,31	1 080	5,73
M. Z.	10,84	1 150	12,46
K. F.	44,3	750	33,22
	44,5	650	28,92
	41,4	900	37,26
	35,0	1 030	36,05
A. K.	38,8	1 100	42,68
	36,2	1 250	45,25
P. M.	62,55	1 230	76,94
	50,85	1 200	61,03

Im Harn von gesunden Ratten wurden bei einer täglichen Harnmenge von 1,5 bis 3,9 ml 12,5 bis 24,3 μMol Aminosäuren gefunden (Tabelle 4). Anschließend wurden die Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff (1 ml/180 g Körpergewicht intraperitoneal) vergiftet. Dies führt bekanntlich zu schweren Schäden an Leber und Niere (SMETANA, 38, CORCORAN, TAYLER und IRVINE, 39, FORBES, 40, HOFFMANN, HIMES, LAZAN, RISZKI und POST, 41), die offenbar konstant mit einer Aminoacidurie einhergehen. Wir fanden bei den gleichen Ratten einen Tag nach der Vergiftung Mengen von 30,03 bis 77,52 μMol Aminosäuren bei einer täglichen Harnmenge von 2,6 bis 5,0 ml/24 Stunden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Im Harn ausgeschiedene Aminosäuremengen bei Ratten vor und einen Tag nach Vergiftung mit CCl_4 .

	Tier Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
Gewicht (g)	220	220	210	225	200	220	190
AS in $\mu\text{Mol/ml}$ v.	7,7	12,8	5,0	8,1	4,4	13,5	5,0
n.	12,5	10,6	19,6	20,4	7,7	16,0	13,5
Harnmenge in ml/24 h	v. 2,5 n. 5,0	1,6 3,0	3,5 2,6	3,0 3,8	3,9 3,9	1,5 3,6	2,3 2,9
Gesamt-AS in $\mu\text{Mol/24 h}$	v. 19,25 n. 62,50	20,48 31,80	17,50 50,96	24,30 77,52	17,16 30,03	20,25 55,60	12,50 39,15

Wir verwendeten das Verfahren ferner zur Bestimmung des Aminosäuregehaltes von Punktatflüssigkeiten (Pleura- und Ascitespunktate). Die entnommenen Proben wurden ebenfalls zunächst enteiweißt und mit Äther ausgeschüttelt. Die erhaltenen Werte lagen bei 14 untersuchten Punktaten in der Größenordnung der Blutaminosäuren, nämlich zwischen 2,09 und 5,67 $\mu\text{Mol Aminosäuren/ml}$ Punktatflüssigkeit. Eine ausführliche Darstellung dieser Untersuchungsergebnisse findet sich in Teil III.

5. Diskussion

Das von uns benutzte Verfahren vereint die Vorzüge der Genauigkeit, der Spezifität und der Einfachheit. Die bei einiger Übung erreichbare Genauigkeit entspricht derjenigen der gasometrischen CO_2 -Bestimmung nach VAN SLYKE (17, 18, 19). Die Spezifität ist vor allem bei der Untersuchung so heterogen zusammengesetzter Flüssigkeiten wie Urin mit hohem Überschuß an Ammoniak und Harnstoff ein großer Vorteil. Die einzigen Substanzen, die die gleiche Reaktion geben, können, wie wir gezeigt haben, auf einfache Weise entfernt werden. Alle zeitraubenden oder aufwändigen Vorbereitungen wie das Einengen größerer Flüssigkeitsmengen, die vorherige Zerstörung von Harnstoff oder die umständliche Entfernung von NH_3 entfallen. Der Harn kann nach Enteiweißung und Ätherextraktion sofort verwendet werden.

Unsere mit Reinsubstanzen erhaltenen Meßwerte ergeben für fast alle im Harn zu erwartenden Aminosäuren die gleiche CO_2 -Menge. Nur bei Cystin ist die Gasentwicklung wesentlich geringer als theoretisch bei vollständiger Decarboxylierung beider CO_2 -Gruppen zu erwarten wäre. Es zeigte sich jedoch, daß nicht alle Aminosäuren mit derselben Geschwindigkeit decarboxyliert werden. CHAPELLE und LUCK (20) haben diese zeitlichen Verhältnisse nicht berücksichtigt. Wenn auch die meisten und physiologisch wesentlichsten Aminosäuren bereits 30 Minuten nach Ingangsetzung der Reaktion vollständig decarboxyliert sind, wie CHAPELLE und LUCK (20) angeben, so gibt es doch einige Ausnahmen, wie z. B. Prolin, Methionin und Cystein, die längere Zeit benötigen. Bei diesen wird zwar nach 30 Minuten bereits ein Wert von 60 bis 85 % erreicht, die Reaktion ist dann jedoch noch nicht beendet, sondern nähert sich erst im Verlauf von 2 bis 3 Stunden asymptotisch einem Endwert. Nach VAN SLYKE (17, 18) verhalten sich die Aminosäuren bei der Reaktion mit Ninhydrin ebenfalls unterschiedlich. Die CO_2 -Entwicklung erfolgt hier zwar etwas schneller, gehorcht aber ähnlichen Kurven. Bei physiologischen Flüssigkeiten machen die mit N-Bromsuccinimid langsamer reagierenden Aminosäuren nur einen geringen Prozentsatz aus. Man wird sich daher im allgemeinen mit Ablesungen in den ersten 60 Minuten begnügen können. Wir haben unsere Messungen in den vorliegenden Versuchen der größeren Exaktheit wegen stets über 3 Stunden hinweg ausgedehnt. Da dann nach CHAPELLE und LUCK (20) schon mit der Decarboxylierung einiger endständiger CO_2 -Gruppen aus Eiweißen zu rechnen ist, haben wir die Harne vorher enteiweißt. Doppelbestimmungen vor und nach Enteiweißung ergaben jedoch keine wesentlichen Unterschiede. Ein vorheriges Enteiweißen erscheint also nicht erforderlich.

CHAPELLE und LUCK (20) arbeiteten nur mit reinen Aminosäurelösungen oder Eiweißen. Wir mußten dagegen bei der Untersuchung von Harn auch das Verhalten anderer in physiologischen Flüssigkeiten vorkommender Stoffe berücksichtigen, die möglicherweise dieselbe Reaktion geben und daher die Spezifität der Bestimmung in diesen Flüssigkeiten einschränken. Wir fanden, daß einige Keto- und Oxysäuren ebenfalls ganz oder teilweise decarboxyliert werden. Sie lassen sich jedoch ohne Schwierigkeiten mit Äther ausschütteln. Ihre Entfernung ist damit wesentlich einfacher als die Entfernung der bei der kolorimetrischen Aminosäurebestimmung störenden Substanzen wie Harnstoff, Ammoniak, Kreatin etc. Lediglich Azetessigsäure konnten wir durch mehrfaches Ausschütteln mit Äther nur zum Teil extrahieren. Wir haben diese kleine Fehlerquelle in Kauf genommen. VAN SLYKE, MacFADYEN und HAMILTON (19) haben die Ketosäuren durch vorheriges Kochen des Harnes entfernt, da sie bei ihrer gasometrischen Bestimmung ebenfalls stören. Einfache organische Säuren oder Hydroxysäuren wie Milchsäure oder Citronensäure entwickeln auch mit Ninhydrin kein CO_2 (VAN SLYKE, MacFADYEN und HAMILTON, 19).

Vergleichen wir unsere Aminosäurewerte für menschlichen Harn mit denen anderer Autoren, die mit anderen Verfahren gewonnen wurden (VAN SLYKE, Mac FADYEN und HAMILTON, 19, SIEMERLING und OLOFF, 32, UZMAN und DENNY-BROWN, 33, MOORE und STEIN, 34, STEIN, BEARN und MOORE, 35, STEGER und STEGER, 36), so liegen unsere Werte für Morgenharn und für 24-Stunden-Harn in demselben Bereich. Auch für die tägliche Aminosäureausscheidung der Ratte werden vergleichbare Werte angegeben (BERGER und ANTENER, 42). Wie weit die von uns verwendete Methode im Einzelfall niedere oder höhere Werte ergibt als andere Verfahren, muß Untersuchungen vorbehalten bleiben, bei denen die Aminosäuren gleichzeitig an demselben Harn mit mehreren verschiedenen Methoden bestimmt werden. Da das Aminosäurespaltprodukt Taurin bei allen kolorimetrischen Verfahren miterfaßt wird und eine der häufigsten ninhydrinfärbaren Substanzen des Harnes darstellt (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF, 37), wird bei diesen Verfahren die "Aminosäuremenge" etwas höher liegen.

Die bekannte Aminoacidurie beim Morbus Wilson und die von uns beobachtete vermehrte Aminosäureausscheidung bei der experimentellen Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Ratte sollen hier nicht weiter diskutiert werden.

II. T E I L

Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Harn bei Gesunden und bei Leberkranken

1. Einleitung

Bei Leberkranken werden seit langem Abweichungen vom normalen Spektrum der Blut- und Harnaminosäuren diskutiert, die für verschiedene Leiden wie Hepatitis, Lebercirrhose, akute gelbe Leberdystrophie usw. charakteristisch sein sollen. Insbesondere wurde dabei eine Vermehrung von schwefelhaltigen und cyklischen Aminosäuren beobachtet (FRANKL, MARTIN und DUNN, 50, SCHREIER und SATTELBERG, 43, CACHIN, DURLACH und BLASS, 44, WALSHE, 13, WALSHE und SENIOR, 45, BICHEL und SOUCHON, 46, MÜTING, 47, WEWALKA, 48, IBER, ROSEN, LEVENSON und CHALMERS, 49). Man hat daraus sogar diagnostische und prognostische Schlüsse ziehen zu können geglaubt. Bei Durchsicht der Literatur (MANN, 51, FRANKL, MARTIN und DUNN, 49, DE VRIES und ALEXANDER, 52, DENT 53, 54, DENT, WALSHE, SHERLOCK und WOLSTENHOLM, 55, SCHREIER und SATTELBERG, 43, CACHIN, DURLACH und BLASS, 44, WALSHE, 13, WALSHE und SENIOR, 45, YI-YUNG HSIN und GILLIS, 56) lassen sich jedoch zwischen den Angaben einzelner Autoren erhebliche Unterschiede und Widersprüche aufzeigen. Da uns in der Kombination von Hochspannungselektro-

phorese und Papierchromatographie ein Verfahren zur Verfügung steht, das schnell das Aminosäurespektrum von Körperflüssigkeiten und Organen zu überblicken gestattet, erschien es lohnend, damit die Harnaminosäuren bei Leberkranken zu untersuchen.

Die vorliegende orientierende Studie sollte zunächst die Frage klären, wie weit bei den klinisch wichtigsten Lebererkrankungen Cirrhose und Hepatitis die in der Literatur behaupteten pathologischen Veränderungen im Spektrum der freien Harnaminosäuren konstant nachweisbar sind. Genaue quantitative Aminosäurebestimmungen mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie sollten, wenn nötig, bei entsprechenden Fällen angeschlossen werden. Die bisher erzielten Ergebnisse und einige mit dieser quantitativen Methodik gewonnene Stichversuche lassen diesen Weg im Augenblick jedoch nicht besonders erfolgversprechend erscheinen. Die gefundenen Unterschiede zum Normalen waren meist gering und ziemlich uncharakteristisch.

2. Auswahl der Fälle

Insgesamt wurden 104 Harn untersucht: Die Harnproben von 24 stoffwechselgesunden Versuchspersonen (Studenten, Laborpersonal, Patienten mit lediglich funktionellen Störungen) dienten als Normalfälle. Bei zwei gesunden Personen wurden Eiweißbelastungen durchgeführt und dabei 8 Harnproben analysiert. 31 Harn stammten von 20 Hepatitisfällen, 24 Harn von 24 Lebercirrhosen. Außerdem wurden zum Vergleich 14 Harn von 3 Patienten mit Wilson'scher Krankheit, der Harn eines Melanosarkomträgers und 2 Harn von 2 gesunden Schwangeren untersucht.

3. Methodik

Wir verwendeten den ersten Morgenurin, da hier die Aminosäurekonzentration am höchsten ist. 10 ml wurden mit 30 ml bei -20°C vorgekühltem Aceton versetzt und der Eiweiß- und Salzniederschlag in einer Kälzentrifuge bei 10 000 Umdrehungen pro Minute scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Vakuum fast bis zur Trockene eingeeengt. In Kontrollversuchen war es nicht möglich, durch irgendein Eiweißfällungsmittel in dieser Flüssigkeit erneut eine Trübung zu bekommen.

Die mit Aqua dest. wieder auf das ursprüngliche Volumen gebrachte Lösung teilten wir dann in 2 Portionen. Eine kleine Menge (0,25 ml) wurde zur Bestimmung des freien Ges.- α -Aminostickstoffs mit Hilfe des in Teil I genauer beschriebenen manometrischen Verfahrens verwendet. Die Hauptmenge wurde nach CONSDEN, GORDON und MARTIN (57) 45 Minuten elektrolytisch entsalzt. In dieser Zeit werden die bei der Papierchromatographie störenden Ionen größtenteils aus

der Flüssigkeit entfernt, so daß einwandfreie Chromatogramme zu erzielen sind. Wir verwendeten eine Entsalzungsapparatur nach der Modifikation von ASTRUP, STAGE und OLSEN (58), die sich als zweckmäßiger zur Entsalzung kleiner Flüssigkeitsmengen erwies. Eine Zerstörung oder Umwandlung einzelner Aminosäuren kann bei diesem Vorgehen weitgehend vermieden werden (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF, 37, KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10). Die entsalzte Lösung wurde erneut eingengt und der Rückstand mit 0,1 ml n/10 HCl aufgenommen (Einengungsverhältnis 1:100).

Davon wurde dann eine 18 μ Mol Gesamtaminosäuren enthaltende Menge, die im Durchschnitt etwa 1 ml ursprünglichen Harnes entsprach, zur Hochspannungselektrophorese und anschließenden Chromatographie punktförmig auf einen 30 x 75 cm großen Filterpapierbogen (Schleicher & Schüll 2043 a) aufgetragen. Die vorausgehende Gesamtaminosäurebestimmung gestattete, die Menge der aufzutragenden Lösung je nach ihrem Aminosäuregehalt zu variieren. Versuche, die Ausgangsmenge aus Rest-N oder spezifischem Gewicht der Harnproben abzuschätzen, blieben unbefriedigend, da zwischen diesen beiden Größen und der Menge des freien α -Aminostickstoffs keine strengen Korrelationen bestehen.

Die Hochspannungselektrophorese wurde 90 Minuten bei 5 000 V (80 V/cm) mit der von KICKHÖFEN und WESTPHAL (59) angegebenen Pufferlösung vom p_H 1,9 (Ameisensäure, Eisessig, Wasser 1:3:16) durchgeführt. Anschließend wurde der Bogen bei 75° C im Trockenschrank getrocknet, senkrecht zur elektrophoretischen Laufrichtung in Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) 20 Stunden aufsteigend chromatographiert und dann mit Ninhydrin nach LEVY und CHUNG (60) gefärbt. Diese Färbmethode erlaubt durch eine sehr kräftige und mannigfaltige Anfärbung der einzelnen Aminosäuren eine sofortige Identifizierung der verschiedenen Flecke. Zum Nachweis der Asparaginsäure, die sich bei stark saurem p_H nicht immer von der Glutaminsäure sicher trennen läßt, wurden eindimensionale Elektropherogramme bei p_H 3,6 (Puffer: Pyridin, Eisessig, Wasser 1:10:90) angefertigt. Dabei wandern nur Asparaginsäure und Glutaminsäure als scharf getrennte Banden anodwärts. Zum Nachweis von Cystin, Cystein und Methionin wurden eindimensionale Chromatogramme (Butanol, Eisessig, Wasser 4:1:5) angefertigt und diese mit einer wässrigen Lösung von Kalium-Permanganat und Natriumbikarbonat (TURBA, 61), in anderen Versuchen mit Platintetrachlorid (TURBA, 61), gefärbt.

Unser Vorgehen erlaubt eine gute Trennung zahlreicher Substanzen und den Nachweis auch sehr geringer Stoffmengen. Als zweidimensionales Verfahren ist es jedoch für quantitative Bestimmungen weniger geeignet. Um eine ungefähre Vergleichsmöglichkeit zwischen den einzelnen Chromatogrammen zu gewinnen, haben wir nach dem Vorgehen von WALSHE (13) die Farbflecken nach Größe und Farbintensität in willkürliche Abstufungen von 1 bis 12 unterteilt. Die aus sämt-

lichen Chromatogrammen einer Serie (Normalfälle, Cirrhosen, Hepatitiden) gezogenen Durchschnittswerte wurden auf den nächstgelegenen halben Wert auf- oder abgerundet. Um möglichst einheitliche Färbungen zu bekommen, wurde vor der quantitativen Bewertung die Ninhydrinfärbung in den Kupferkomplex überführt (KAWERAU und WIELAND, 62). Alle Aminosäuren erscheinen danach annähernd gleichmäßig hellrot. Dies erleichtert und verbessert die Auswertung. Trotzdem können die einzelnen Substanzen nur mit sich selbst verglichen werden, da ihre Ninhydrinempfindlichkeit verschieden ist. Die Auswertung erfolgte stets unter gleichen Beleuchtungsbedingungen. Um möglichst einheitliche Fleckengrößen zu erreichen, wurden alle technischen Details wie Laufzeit, Spannung, Temperatur etc. in allen Versuchen weitgehend konstant gehalten. Für orientierende Untersuchungen an klinischem Material war das Verfahren so recht brauchbar.

4. Ergebnisse

a) Normalfälle

Der Gesamtaminosäurestickstoff des Morgenharnes von 24 gesunden Versuchspersonen schwankte zwischen 15 und 25 μMol Gesamt- α -Aminosäuren pro ml Harn (Durchschnittswert 18,4 $\mu\text{Mol/ml}$). Vergleichsweise wurden im 24-Stunden-Harn nur 3,8 bis 11,6 $\mu\text{Mol/ml}$ gefunden (vgl. Tabelle 3, Ste. 17). Die Konzentration ist also im Morgenharn größer, die Schwankungsbreite geringer als im 24-Stunden-Harn.

Die Chromatogramme zeigten ein ziemlich regelmäßiges Bild. Die 20 ninhydrinpositiven Substanzen Äthanolamin, Alanin, α -Aminobuttersäure, β , γ -Aminobuttersäure, Arginin, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Isoleucin-Leucin, Lysin, Phenylalanin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin, Tryptophan und Valin wurden regelmäßig gefunden. Asparaginsäure wurde nur in 5 Fällen nachgewiesen, obwohl wir zu ihrem Nachweis stets eindimensionale Hochspannungs-Elektropherogramme bei pH 3,6 anfertigten, auf denen Asparaginsäure gut von allen anderen Substanzen getrennt werden kann. Cysteinsäure fanden wir in geringer Konzentration in 12 Fällen. Möglicherweise handelt es sich um ein in-vitro-Oxydationsprodukt. Methionin wurde auf zweidimensionalen, mit Ninhydrin gefärbten Chromatogrammen nur in 9 Fällen eindeutig nachgewiesen. Wahrscheinlich war die nicht immer ganz einwandfreie Trennung vom oft recht großen Valinfleck mit dafür verantwortlich. Auf eigens angefertigten, mit Platintetrachlorid behandelten Chromatogrammen war Methionin, das sich mit Ninhydrin schlecht färbt (SCHÖNENBERG, 63), noch in einigen weiteren Fällen zu erkennen. Häufig wurden geringe Mengen von Cystein gefunden. Oxyprolin konnte viermal, Prolin in keinem Fall festgestellt werden. Ornithin konnten wir bei 17 Versuchspersonen

nachweisen. Die vermutlich regelmäßig in geringer Konzentration im Harn auftretende Aminosäure läßt sich jedoch schlecht vom Lysin trennen. Bei stärkerer Lysinausscheidung überlappen sich beide Flecken. Die Auftrennung von β -Aminobuttersäure, γ -Aminobuttersäure und β -Aminoisobuttersäure ist bei dem geschilderten Vorgehen nicht möglich. Der als " γ -Aminobuttersäure" bezeichnete Fleck kann daher auch die anderen beiden Substanzen mitenthalten. Methylhistidin ist durch unser Vorgehen nicht vom Histidin trennbar. Auch hier können im entsprechenden Flecken beide Stoffe vorhanden sein.

Außer den genannten Substanzen traten zahlreiche bisher nicht identifizierte Flecken auf. Davon wurde der mit x_1 bezeichnete regelmäßig gefunden. Die Substanz hat bei saurem p_H eine sehr große Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Es dürfte sich daher am ehesten um ein niedermolekulares Amin, vielleicht Histamin, handeln. Die mit x_5 bezeichnete Substanz hat manche Eigenschaften mit Phenylalanin und Tyrosin gemeinsam (ähnliche Laufstrecken bei Elektrophorese und Chromatographie, ähnlicher Farbton bei Färbung mit Ninhydrin). Möglicherweise handelt es sich um Dioxyphenylalanin. Andere unidentifizierte Flecken mit geringer Wanderungsgeschwindigkeit sowohl im elektrischen Feld als auch bei der Papierchromatographie werden wahrscheinlich durch die im Harn reichlich vorkommenden niederen Peptide verursacht. Nach Salzsäurehydrolyse verschwinden sie. Der stets in großer Menge vorhandene Harnstoff ließ sich bei Betrachtung im UV-Licht leicht identifizieren. Wir legten auf seine Erfassung keinen Wert. Abbildung 3 zeigt ein typisches zweidimensionales Hochspannungselektrophero-Chromatogramm der normalen Harnaminosäuren.

Der Versuch, Fleckengröße und Farbdichte der vorhandenen Aminosäuren zwecks besserer Vergleichbarkeit in ein Schema willkürlicher relativer Werte einzuordnen, kann im Einzelfall leicht zu Fehldeutungen Anlaß geben. Wenn man größere Serien gleichartiger Chromatogramme überblickt, zeigt sich jedoch meist ein ziemlich charakteristisches Verhältnis der einzelnen Aminosäuren zueinander. Die relative Menge der einzelnen Harn-Aminosäuren scheint zwischen verschiedenen normalen Versuchspersonen recht wenig zu schwanken, wenn man jeweils von einer bestimmten, vorher ermittelten Gesamtaminosäuremenge ausgeht. Im Durchschnitt wurde bei den 24 untersuchten Normalpersonen die in Tabelle 5 angegebene relative Farbdichte und Fleckengröße gefunden.



Abbildung 3: Kombiniertes zweidimensionales Elektrophero-Chromatogramm, das die Auftrennung der Harnaminosäuren eines Normalfalles zeigt. (Hochspannungselektrophorese mit 80 V/cm, 90 Min. bei p_H 1,9. Anschließend aufsteigende Papierchromatographie senkrecht zur elektrophoretischen Laufrichtung für 20 Stunden in Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5). Färbung mit Ninhydrin nach LEVY und CHUNG (60). Anschließende Besprühung mit Kupfernitrat. x = Auftragsstelle).

Tabelle 5: Mengen verschiedener Harnaminosäuren in willkürlichen Einheiten, beurteilt nach Fleckengröße und Farbintensität zweidimensionaler Elektrophore-Chromatogramme. Spalte 2: Durchschnittswerte von 24 Chromatogrammen von 24 Normalfällen. Spalte 3: Durchschnittswerte von 25 Chromatogrammen von 14 Fällen von schwerer Hepatitis zu Beginn der Erkrankung. Spalte 4: Durchschnittswerte von 8 Chromatogrammen von 8 Fällen mit schwerer, dekompensierter Lebercirrhose im Endstadium. " γ -Aminobuttersäure" kann β -Aminobuttersäure und β -Aminoisobuttersäure mit-enthalten. Die Werte der einzelnen Aminosäuren sind nur untereinander vergleichbar.

Substanz	Normalfälle	Hepatitisiden	Cirrhosen
Aethanolamin	3,5	5,5	5,0
Alanin	5,5	4,5	4,0
α -Aminobuttersäure	1,0	0,5	0,5
β γ -Aminobuttersäure,			
β -Aminoisobuttersäure	2,5	2,5	5,0
Arginin	1,0	1,0	0,5
Asparaginsäure	0,5	0,5	0,5
Cystein	0,5	0,5	0,5
Cysteinsäure	0,5	0,5	0,5
Cystin	1,5	3,5	2,5
Glutamin	3,5	2,5	2,5
Glutaminsäure	1,0	1,0	0,5
Glykokoll	12,5	8,5	9,5
Histidin,			
Methylhistidin	4,0	6,0	5,0
Leucin, Isoleucin	3,0	4,5	4,0
Lysin	3,0	3,5	2,5
Methionin	0,5	0,5	0,5
Ornithin	0,5	0,5	0,5
Oxyprolin	0,5	0,5	0,5
Phenylalanin	1,0	2,5	3,0
Prolin	-	3,0 (1 Fall)	-
Serin	3,0	2,5	2,5
Taurin	3,0	2,5	5,5
Threonin	2,0	1,5	2,5
Tryptophan	2,0	3,5	2,5
Tyrosin	2,5	4,0	3,0
Valin	2,5	1,5	2,0
α_1	2,5	1,5	2,0

Unterschiedliche Eiweißmengen in der Diät sind nur von geringem Einfluß auf die Aminosäureausscheidung. Bei 2 gesunden Versuchspersonen bestimmten wir die Harnaminosäuren und gaben dann je 300 g Quark (0,5 g Eiweiß/kg Körpergewicht). Die folgenden, jeweils in fünfstündigem Abstand gewonnenen Harnproben wurden erneut untersucht. Nur bei der zweiten Probe war ein leichter Anstieg des Gesamtaminostickstoffs und verschiedener Einzelaminosäuren erkennbar. SCHÖNENBERG (63) kam vor uns zu ähnlichen Ergebnissen. Eine sogenannte overflow-Aminoacidurie, wie sie bei starker Vermehrung einzelner Plasmaaminosäuren beschrieben wird, ist also auf diätetischem Wege kaum erreichbar.

b) Hepatitisfälle

Von 20 Patienten mit Hepatitis wurden 31 Chromatogramme angefertigt. Bei 6 Fällen zeigte sich keinerlei Abweichung von der Norm. Der Beginn der Erkrankung lag hier fast ausnahmslos einige Wochen zurück. Auch das klinische Bild befand sich auf dem Wege der Besserung, obwohl die Serumlabilitätsproben zu dieser Zeit noch stark pathologisch sein konnten. Die restlichen 24 Untersuchungen stammen von 14 Fällen, meist mit schwerem klinischen Krankheitsbild. Von diesen wurden vier wiederholt, einer achtmal im Verlauf von mehreren Wochen untersucht. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die üblichen klinischen Laborreaktionen dieser Fälle.

Der freie Gesamt- α -Aminostickstoff dieser Patienten schwankte zwischen 17,2 und 24,6 $\mu\text{Mol/ml}$ Harn mit einem Durchschnittswert von 21,8 $\mu\text{Mol/ml}$. Die ausgeschiedene Gesamtaminosäuremenge war also nicht oder nur sehr wenig vermehrt.

Auf den Chromatogrammen konnten wir bis zu 30 ninhydrinpositive Substanzen gleichzeitig nachweisen. 24 traten regelmäßig bei allen Fällen auf. 4 davon sind unbekannt. Meistens wurde ein gewisser Anstieg von Äthanolamin, Cystin, Leucin/Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Valin beobachtet. Oft waren auch Lysin und Histidin vermehrt. Nur bei 3 Patienten vermerkten wir einen stärkeren Anstieg von Taurin (Fall K. M., L. A. und N. R.). Methionin wurde bei etwa 50 % aller Hepatitisfälle als deutlicher Fleck nachgewiesen, während es im Normalharn nur selten identifiziert werden konnte. Auch die Asparaginsäure konnte meistens gut vom Glutaminfleck getrennt werden. Manchmal erschien Oxyprolin. Ein sehr starker Prolinfleck wurde nur einmal beobachtet (Fall K. A.). Die Konzentration von Glutamin und von Glykokoll, der sonst in größter Menge vorhandenen Aminosäuren, schien dagegen häufig etwas vermindert. Insgesamt erscheint der Anteil der cyclischen Aminosäuren und des Cystins, oft auch des Valins und Äthanolamins etwas vermehrt. Bei den Patienten St. K., Z. W. und K. M., bei denen die Aminosäureausscheidung mehrmals untersucht wurde, wurde

Tabelle 6: Serumbilirubinwerte und Ausfall verschiedener Serumlabilitätsproben der 14 Patienten mit Hepatitis, bei denen pathologische Aminosäureausscheidungen im Harn gefunden wurden. (Bilirubin direkt und indirekt nach Hijmans van den BERGH, 64, Takata-Reaktion, abgestuft nach TAKATA, 65, oder quantitativ nach MANCKE und SOMMER, 66, Thymoltest nach MACLAGAN, 67, WELTMANN'sches Koagulationsband, 68).

Patient	Bilirubin dir. /indir.	Takata- Reaktion	Thymol	Weltmann Band
St. K.	+++/17,0	+ (+)	++	7 1/2
Z. W.	++/5,0	Ø	++	6
K. A.	++/7,1	Ø	++	6
L. F.	+/0,54	80	1,6	6
E. S.	3,0/4,6	++	+++	8
N. H.	++/4,5	+	++	7 1/2
M. P.	4,75/5,65	60	4,4	7 1/2
P. H.	+++/3,6	50	++	7 1/2
K. M.	++(+)/5,7	(+)	++	7 1/4
K. A.	++/4,0	+	+++	7 1/2
L. A.	16,6/17,0	100	3,9	7 1/2
N. R.	++/3,5	++	+++	8
L. H.	++/6,4	++(+)	+++	8
F. G.	++/4,85	Ø	+++	6

spätestens 5 - 10 Tage nach Beginn der Erkrankung ein normales Bild erhalten. Nur bei einer Patientin mit besonders schwerer Hepatitis epidemica (K. A.), bei der der Harn in Abständen von wenigen Tagen über den gesamten Krankheitsverlauf hin untersucht wurde, war erst nach etwa 3 Wochen eine völlige Normalisierung zu beobachten.

Eine deutliche Parallelität zum Ausfall der Serumlabilitätsproben wurde vermißt. Wir können uns daher der von WALSHE (13) versuchten Einteilung der Fälle nach positivem oder negativem Ausfall dieser Proben nicht anschließen.

c) Lebercirrhosen

Der Harn von 24 Patienten wurde untersucht. Nur bei einem Drittel der Fälle, bei 8 Patienten, waren eindeutige Veränderungen des Aminosäurespektrums erkennbar. Bei diesen handelte es sich ausnahmslos um sehr schwere, bereits dekompensierte Lebercirrhosen im Endstadium mit Ascites, hoher Globulinvermehrung und Koma bzw. Präkoma hepaticum. Tabelle 7 gibt einen Überblick über den Ausfall der übrigen Laborbefunde bei diesen Fällen.

Der freie Gesamtaminostickstoff im Morgenurin war auch bei diesen Patienten meist nicht oder nur wenig erhöht. Die Werte schwankten zwischen 16,1 und 26,5 $\mu\text{Mol/ml}$ Harn mit einem Durchschnitt von 20,5 $\mu\text{Mol/ml}$. Von einer erheblichen oder allgemeinen Aminoacidurie kann also auch hier nicht gesprochen werden.

Tabelle 7: Überblick über Serumbilirubinwerte, Serumlabilitätsreaktionen, Anteil der γ -Globuline in Relativ-% und sonstigen klinischen Befund bei den 8 Patienten mit Lebercirrhosen, bei denen Veränderungen im Spektrum der Harnaminosäuren beobachtet wurden. Bei Patient S. H., S. K. und S. M. handelte es sich um posthepatische Cirrhosen. Patient D. J. hatte eine cholangitische Cirrhose. Die Genese der anderen Cirrhosen blieb ungeklärt. (Klinische Laborreaktionen wie bei Tab. 6).

Patient	Bilirubin dir./ind.	Takata	Thymol	Weltm.- band	Glob. Rel. %	Bemerkungen
S. H.	2,0/3,1	+++	++++	10	58,0	Koma, Sektion
S. K.	Ø/0,28	++	++	7 1/2	32,0	Ascites, Laparoskopie
G. A.	Ø/0,26	++	+++	8	42,1	Ascites
D. K.	2,1/3,1	50	1,4	8	37,4	Koma
S. M.	0,26/0,54	+	(+)	7 1/2	-	Ascites, Oesoph. var. blutung, Laparoskop.
H. D.	1,25/1,65	40	3,1	8	57,1	Ascites
D. J.	+2,4	+++	+++	8	40,7	-
E. K.	3/1,24	Ø	++	6	32,1	Ascites, Laparoskopie

Die Zahl der gefundenen und identifizierten Einzelaminosäuren entspricht der der beiden Vergleichsgruppen. Das Aminosäurespektrum zeigte jedoch einige allen 8 Fällen gemeinsame Besonderheiten. So war stets der Taurin- und der " γ -Aminobuttersäurefleck" stark vergrößert. Allein daran konnten die Chromatogramme dieser Fälle erkannt werden. Weiterhin waren vielfach auch die bei der Hepatitis beobachteten Veränderungen nachweisbar, so die vermehrte Ausscheidung von Äthanolamin, Phenylalanin und Tryptophan.

Bei den restlichen 16 Patienten, bei denen nur leichte oder gar keine Veränderungen im Spektrum der Harnaminosäuren gefunden wurden, handelte es sich meist um weniger schwere und kompensierte Lebercirrhosen. Die Serumlabilitätsreaktionen waren hier nicht einheitlich, meist jedoch ebenfalls weniger schwer verändert. Im Urin fanden wir öfters eine geringe Vermehrung von Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Valin, Äthanolamin und Taurin. Jedoch waren die Befunde sehr wechselnd und oft wenig ausgeprägt. Sichere Unterschiede zu Normalfällen fehlten häufig ganz, sogar bei einigen klinisch schwereren Krankheitsbildern.

Auch bei der Lebercirrhose geht die relative Vermehrung gewisser Aminosäuren hauptsächlich auf Kosten anderer Aminosäuren. Es handelt sich daher eher um Verschiebungen im Aminosäurespektrum, als um eigentliche Aminoacidurien. Im Ganzen sind die Unterschiede zwischen Lebercirrhosen und Hepatitiden ziemlich gering und mehr gradueller Natur. Beidesmal ist das pathologische Aminosäurespektrum wahrscheinlich der Ausdruck einer schweren Leberschädigung, vielleicht einer gewissen Stoffwechselinsuffizienz. Kompensierte Cirrhosen und Hepatitiden, die das erste akute Stadium überstanden haben, zeigen keine oder nur geringe Veränderungen. Die große Funktionsreserve der Leber scheint vor allem bei der Cirrhose noch ziemlich lange einen normalen Aminosäurestoffwechsel zu garantieren.

d) Weitere Untersuchungsergebnisse

Bei drei Patienten mit Wilson'scher Krankheit (hepatocerebrale Degeneration) wurden von 10 Morgenurinen und vier 24-Stunden-Harnen kombinierte Elektrophero-Chromatogramme angefertigt. Geht man dabei von der gleichen Gesamtaminosäuremenge aus, so ergeben sich keine mit Sicherheit feststellbaren Abweichungen vom Normalfall. Die Bestimmung des Gesamt- α -Amino-Stickstoffs zeigte bei allen Proben im Gegensatz zu Hepatitis und Lebercirrhose eine deutliche Aminoacidurie. Die Gesamtaminosäuremengen im 24-Stund-Harn lagen zwischen 28,9 und 76,9 mMol (Tab. 3, Ste. 17). Bei den Morgenurinen betrug die Aminosäuremenge stets über 40 μ Mol/ml. Es handelt sich also wahrscheinlich um einen ziemlich gleichmäßigen Anstieg fast sämtlicher Aminosäuren im Harn ohne deutliche Verschiebungen im Spektrum.

Bei einem Fall von Melanosarkom waren Phenylalanin und Tyrosin deutlich vermehrt. Auch der Fleck der mit x5 bezeichneten, nicht identifizierten Substanz war deutlicher als sonst. Vielleicht handelt es sich hier um Dioxyphenylalanin. Der Beweis konnte nicht erbracht werden, da uns die Reinsubstanz fehlte. Die Melanogenproben im Harn waren hoch positiv.

Schwangerschaftsaminosäureurie: Bei zwei gesunden Schwangeren (mens VII und VIII) fand sich eine gegenüber der Norm vermehrte Aminosäureausscheidung mit $25 \mu\text{Mol/ml}$ bzw. $28,5 \mu\text{Mol/ml}$. Im Gegensatz zu den Patienten mit Leberschäden waren hier keine Verschiebungen im Aminosäurespektrum erkennbar, sondern die meisten Aminosäuren schienen gleichmäßig etwas vermehrt ausgeschieden zu werden.

5. Diskussion

Die meisten unserer Voruntersucher (FRANKL, MARTIN und DUNN, 50, SCHREIER und SATTELBERG, 43, CACHIN, DURLACH und BLASS, 44, WALSHE, 13, WALSHE und SENIOR, 45, BICHEL und SOUCHON, 46, MÜTING, 47, WEWALKA, 48, IBER, ROSEN, LEVENSON und CHALMERS, 49, MANN, 51, de VRIES und ALEXANDER, 52, DENT, 53, 55, DENT, WALSHE, SHERLOCK und WOLSTENHOLM, 55, YI-YUNG HSIN und GILLIS, 56) bedienten sich zur getrennten Bestimmung der einzelnen Aminosäuren mikrobiologischer Methoden oder in neuerer Zeit der weniger aufwändigen zweidimensionalen Papierchromatographie. Dabei wurde die Konzentration der chromatographisch getrennten Substanzen vielfach je nach Größe der erhaltenen Flecken mit einem, zwei oder drei Kreuzen bewertet oder mit willkürlichen Zahlenwerten versehen. Auch WALSHE (13) benutzte in seiner umfangreichen Arbeit über die freien Aminosäuren bei Erkrankungen der Leber dieses semiquantitative Verfahren.

Wir konnten zwar durch Verwendung der Hochspannungselektrophorese die Auftrennung der verschiedenen Stoffe gegenüber früheren Untersuchern wesentlich verbessern. Die ziemlich unbefriedigende Auswertung der Chromatogramme durch rein visuellen Vergleich mußte jedoch beibehalten werden, da uns bei der Durchführung der Untersuchungen noch kein genaues Verfahren zur getrennten quantitativen Bestimmung von 20 oder mehr einzelnen Aminosäuren zur Verfügung stand. Die subjektive Beurteilung von Chromatogrammen schließt immer Täuschungsmöglichkeiten ein, die ihren Aussagewert beschränken. Wir wollen die hier mitgeteilten Ergebnisse daher trotz der mühevollen Kleinarbeit, die die Bearbeitung des umfangreichen Materials mit sich brachte, lediglich als orientierende Studie aufgefaßt wissen, die der späteren Ergänzung durch exakte quantitative Untersuchungen mit modernen, in jüngster Zeit entwickelten Verfahren bedarf. Wir denken dabei in erster Linie an die Elutionschromatographie an Ionenaustauschersäulen.

Die einfache kolorimetrische Bestimmung der aus zweidimensionalen Chromatogrammen eluierten Aminosäureflecken bedeutet dagegen keinen Vorteil. Das Verfahren ist nach dem Urteil kritischer Autoren mit einer Fehlergrenze von mindestens 30 % belastet. Wir selbst haben dieses Vorgehen zunächst ebenfalls versucht, gaben es aber nach einigen unbefriedigenden Vorversuchen wieder auf, da die erhaltenen Werte lediglich eine Pseudogenauigkeit vortäuschten.

Nach diesen Vorbemerkungen sollen unsere Ergebnisse mit aller Vorsicht interpretiert werden: Der Gesamtaminostickstoff des Normalharnes und das Spektrum der normalen Harnaminosäuren stimmt bei unseren Fällen mit den bisherigen Mitteilungen der Literatur überein (STEIN, 29, DECKER, RIFFART und WAGNER, 69). Bei Leberkrankheiten fanden wir gewisse Abweichungen im Spektrum der freien Harnaminosäuren. Die Gesamtmenge der freien α -Aminosäuren des Harns, die als einzige Größe mit exakter Methodik genau quantitativ bestimmt werden konnte, war bei den untersuchten Fällen von zum Teil schwersten dekompenzierten Lebercirrhosen und Hepatitiden nicht oder kaum erhöht. Bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Ratte, über die wir in Teil I berichtet haben, und beim Morbus Wilson wurden dagegen schwerere Aminoacidurien beobachtet (Tab. 4, Ste. 18, bzw. Tab. 3, Ste. 17). Wir konnten sie mit unserer manometrischen Methode gut erfassen. Nur hier konnten wir einheitliche und für die Krankheit charakteristische Veränderungen im Harn feststellen. Jedoch handelt es sich bei dieser Aminoacidurie in erster Linie um eine renale Störung (UZMAN und DENNY-BROWN, 33). Durch die gleichzeitig bestehende Lebercirrhose ist sie nicht erklärbar. Auch die seit langem bekannte vermehrte Aminosäureausscheidung während der normalen Gravidität (HONDA, 70, WALRAFF, BRODIE und BORDEN, 71, SHEFT und OLDHAM, 72, MILLER, RUTTINGER und MACY, 73, CHRISTENSEN, DATE, SCHÖNHEYDER und VOLQUARTZ, 74) wurde sicher erfaßt. Eine vermehrte Aminosäureausscheidung beim Leberkranken hätte uns daher nicht entgehen können. Es kann sich, wie bereits GABUZDA, ECKHARDT und DAVIDSON (75) feststellten, hier nicht um eine allgemeine Aminoacidurie handeln, sondern es kommt allenfalls zu gewissen Verschiebungen im Spektrum mit einer relativen Vermehrung vor allem der cyclischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, häufig auch der schwefelhaltigen Stoffe Cystin und Taurin. Manchmal waren noch einzelne andere Substanzen wie Äthanolamin, Valin und die Leucine etwas vermehrt. Diese Veränderungen waren jedoch ebenfalls geringer als wir nach Durchsicht der Literatur (DUNN, AKAWAIE, YEH und MARTIN, 76) erwartet hatten. Zudem besteht eine sehr große Schwankungsbreite nicht nur innerhalb der untersuchten Gruppen, sondern auch bei ein und demselben Patienten. Im allgemeinen wurden die Veränderungen nur bei schwerer Erkrankung gefunden und bildeten sich mit Besserung des Leidens zurück. Manchmal waren auch bei klinisch schweren Ver-

laufsformen mit stark pathologischen Leberreaktionen die Veränderungen im Aminosäurespektrum des Harns wenig ausgesprochen.

Die Unterschiede zwischen Hepatitis und Lebercirrhose sind zu gering, als daß daraus diagnostische oder pathophysiologische Schlußfolgerungen gezogen werden konnten. Meist sind die gleichen Aminosäuren betroffen. Prolin wurde nur in einem Fall von Hepatitis erheblich im Harn ausgeschieden. Deutliche Veränderungen fanden sich nur bei schweren klinischen Bildern, bei dekompensierten Lebercirrhosen und im ersten Stadium der Hepatitis. Bei allen kompensierten Cirrhosen und den weniger schweren Hepatitiden ist wahrscheinlich die Funktionsreserve der Leber für den Aminosäurestoffwechsel so groß, daß schwere Veränderungen des Aminosäurespektrums im Harn ausbleiben. Die jeweils noch bestehende Funktionsreserve ist klinisch besonders schwer festlegbar. Alle systematischen Aussagen sind daher schwierig. Auch Untersucher, wie z. B. WALSHE (13), die charakteristische, bestimmten klinischen Krankheitsbildern zuordenbare Veränderungen im Spektrum der Blut- und Harnaminosäuren gefunden zu haben glauben, lassen die Deutung dieser Befunde offen.

Die Beurteilung wird weiter erschwert durch das oft sehr uneinheitliche Patientenmaterial. Häufig fehlt die Möglichkeit, gerade bei besonders interessierenden Fällen den tatsächlichen Zustand der Leber durch Laparoskopie und Biopsie festzulegen. Dazu kommen bei schweren Lebererkrankungen oft gleichzeitig Nierenveränderungen, deren Einfluß auf die Aminosäureausscheidung schwer zu beurteilen ist.

Beim gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse sollten daher zunächst systematische Untersuchungen bei experimentellen Leberschäden an Versuchstieren vorgenommen werden. Vielleicht wird man dadurch zu klareren Vorstellungen über die Stoffwechselfunktion der Leber gelangen. Wir haben daher nach einigen orientierenden Stichversuchen auch darauf verzichtet, die aufwändigere Elutionschromatographie an der Ionenaustauschersäule zur Untersuchung weiterer Patienten heranzuziehen, so notwendig diese Untersuchungen auch in Zukunft sein werden. Im gegenwärtigen Zeitpunkt, wo systematische, durch exakte Grundlagenforschung erarbeitete Kenntnisse noch weitgehend fehlen, hätten wahrscheinlich auch genauere, am klinischen Einzelfall erhobene Werte zu keiner vertieften Ansicht über die Funktion der Leber im Aminosäurestoffwechsel und die Art ihrer Störung bei verschiedenen Erkrankungen geführt. Nur dies macht solche Untersuchungen aber sinnvoll.

III. T E I L

Die freien Aminosäuren in Ascites- und Pleurapunktaten

1. Einleitung

Während den freien Aminosäuren des Blutplasmas bereits zahlreiche Untersuchungen gewidmet wurden (HIER und BERGEIM, 77, SCHREIER und PLÜCKTHUN, 7, HOFSTATTER, ACKERMANN und KOUNTZ, 8, JOHNSON und BERGEIM, 78, STEIN und MOORE, 9, McMENAMY, LUND und ONCLEY, 79, KELLEY und WAISMAN, 80, MÜTING, 47, KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10), ist über den Aminosäuregehalt von serösen Ergüssen noch recht wenig bekannt. Wir konnten bei Durchsicht umfangreicher Literatur keine einzige Arbeit finden, in der die verschiedenen freien Aminosäuren dieser Flüssigkeiten bei einer größeren Anzahl von Fällen bestimmt wurden. Auch für den Gesamtaminostickstoff gibt es bisher nur spärliche, meist ziemlich unzuverlässige, ältere Angaben (LUSTIG und FÜRTH, 81, REICHE, 82, LICHTWITZ, 83). Dies ist bemerkenswert, denn verschiedene andere, in serösen Ergüssen vorkommende Stoffe wurden bereits in eingehenden Arbeiten (GREENE, BOLLMANN, KEITH und WAKEFIELD, 84, BALINT und BENKÖ, 85, GELENGER und WIGGERS, 86, ENGELBACH, 87, CALNAN, WINFIELD und CROWLEY, 88, KELLER, 89, 90) untersucht, insbesondere die Eiweißkörper (KELLER, 89, WINTER und TRAUB, 91, FELDER, 92, WUNDERLY und WUHRMANN, 93, TRAUB, 94, FUCHS, 95, VANNINI und IPPOLITO, 96). Da wir glauben, daß auch der Bestimmung der freien Aminosäuren eine gewisse Bedeutung zukommt, vor allem im Hinblick auf den Mechanismus, mit dem diese Stoffe in die Flüssigkeiten hineingelangen, haben wir die vorliegende Studie unternommen.

2. Methodik

Untersucht wurden 23 Punktate (9 Exsudate, 14 Transsudate) aus Pleura- und Bauchhöhle. Der Gesamt-Aminosäuregehalt wurde nach dem in Teil I genauer beschriebenen manometrischen Verfahren nach CHAPELLE und LUCK (20) quantitativ bestimmt. Die Einzelaminosäuren wurden nach zweidimensionaler Auftrennung durch das bewährte hochspannungselektrophoretisch-papierchromatographische Verfahren (vgl. Teil II) qualitativ bestimmt. Damit lassen sich bis $0,5 \mu\text{gr}$ pro Einzelaminosäure sicher nachweisen. Die Auftragsmenge zur Anfertigung der kombinierten Elektrophero-Chromatogramme wurde nach dem Ergebnis der Gesamtaminosäurebestimmung so variiert, daß stets die gleiche Aminosäuremenge auf das Papier kam. Hierdurch können Verschiebungen im Aminosäurespektrum leichter beurteilt werden. Die quantitative

Bestimmung der Einzelaminosäuren erfolgte in einigen ausgewählten Fällen nach Trennung an Ionenaustauschersäulen (MOORE und STEIN, 97). Das Säuleneluat wurde dabei kontinuierlich mit Ninhydrin versetzt und die Extinktion nach MOORE, SPACKMAN und STEIN (98) und SPACKMAN, STEIN und MOORE (99) automatisch registriert. Wir verwendeten dazu die von HANNIG (100) angegebene Apparatur der Firma Bender & Hobein, München.

3. Durchführung der Versuche

20 ml Ascites- oder Pleurapunktat wurden gleich nach der Entnahme mit 60 ml Aceton in der Kälte enteiweißt. Der Eiweiß- und Salzniederschlag wurde abzentrifugiert und der Rückstand erneut mit Aceton ausgewaschen. Die Zentrifugate wurden vereinigt und im Vakuum das Aceton ausgetrieben. Die verbleibende Lösung wurde mit destilliertem Wasser wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht und dann zur Entfernung der Lipide und der bei der manometrischen Aminosäurebestimmung störenden Ketosäuren mehrmals mit gleichem Volumen Äther ausgeschüttelt. Hiervon wurde 1 ml zur manometrischen Bestimmung entnommen. Der Rest wurde 30 Minuten nach CONSDEN, GORDON und MARTIN, 57, elektrolytisch entsalzt und im Vakuum vorsichtig zur Trockene eingengt. Den Rückstand nahmen wir mit 0,1 ml n/10 HCl im Verhältnis 1 : 200 auf. Davon wurde eine 18 μ Mol Gesamtaminosäuren enthaltende Menge (entsprechend 2,24 - 8,65 ml ursprünglicher Flüssigkeit) punktförmig auf Filterpapier (Schleicher & Schüll 2043 b, Format 75 x 35 cm) aufgetragen. Hochspannungselektrophorese: 90 Min., Spannung: 4 000 - 5 000 V (60 - 80 V/cm), Puffer: Ameisensäure, Eisessig, Wasser 1:3:16 (p_H 1,9). Nach der Elektrophorese wurde der Bogen getrocknet, dann 20 Stunden senkrecht zur elektrophoretischen Laufrichtung aufsteigend chromatographiert und mit Ninhydrin nach LEVY und CHUNG (60) entwickelt.

Zur Ionenaustauscher-Chromatographie wurde 1 ml einer im Verhältnis 1:10 eingengten, enteiweißten Probe aus Pleura- oder Ascitespunktat auf die Austauschersäule aufgetragen. Die Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren geschah an einer 120 cm langen, mit Dowex X 8 (400 - 800 mesh) gefüllten, durch einen Flüssigkeitsmantel gleichmäßig temperierten (Temp. 50° C) Glassäule (lichte Weite 9 mm). Die Elution wurde mit einem Citratpuffer von p_H 3,25 begonnen. Nach 5 Stunden wurde der p_H -Wert kontinuierlich auf 5,4 erhöht und die Analyse nach dem Erscheinen des Tyrosingipfels (14 Stunden nach Beginn der Elution) beendet. Die basischen Aminosäuren wurden an einer 50 cm langen, mit Amberlite IRC 50 gefüllten Säule (lichte Weite 5 mm) getrennt. Zur Elution diente ein Puffer von p_H 7,0. Temperatur ebenfalls 50° C. Das Eluat wurde kontinuierlich mit einer gepufferten Ninhydrinlösung versetzt und nach Farbentwicklung die Extinktion automatisch bei den Wellenlängen $\lambda = 578 m\mu$ und $\lambda = 436 m\mu$ gemessen und in Kurvenform registriert. Für weitere methodische Einzelheiten ver-

weisen wir auf die Originalliteratur (MOORE, SPACKMANN und STEIN, 98, SPACKMANN, STEIN und MOORE, 99, HANNIG, 100).

4. Ergebnisse

a) Gesamt- ∞ -Aminostickstoff

Die gefundenen Gesamt-Aminosäuremengen liegen zwischen 2,09 und 5,67 $\mu\text{Mol/ml}$ Punktatflüssigkeit (Tabelle 8). Ein einzelner extrem hoher Wert von 8,38 μMol stammt von einem stark hämorrhagischen Pleuraerguß bei Erythematodes visceralis mit Nephritis und wechselnder Rest-N Erhöhung auch im Serum. Unterschiede zwischen Exsudaten und Transsudaten konnten nicht festgestellt werden. Auch war die Herkunft ohne Belang. Im Ascites wurden ähnliche Aminosäurekonzentrationen gefunden wie in Pleurapunktaten. Ebenso fehlten Korrelationen zum Eiweißgehalt oder spezifischen Gewicht der Flüssigkeiten. Die Gesamtaminosäurewerte liegen in ähnlichen Bereichen wie die des Blutplasmas (STEIN und MOORE, 9, KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10, HAMILTON und van SLYKE, 18, RUBINSTEIN und PRYCE, 31). Während der freie ∞ -Aminostickstoff des Plasmas zwischen verschiedenen Versuchspersonen jedoch nur recht wenig schwankt (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10), liegt die Streubreite bei unserer Punktatflüssigkeiten mit über 120 % recht hoch.

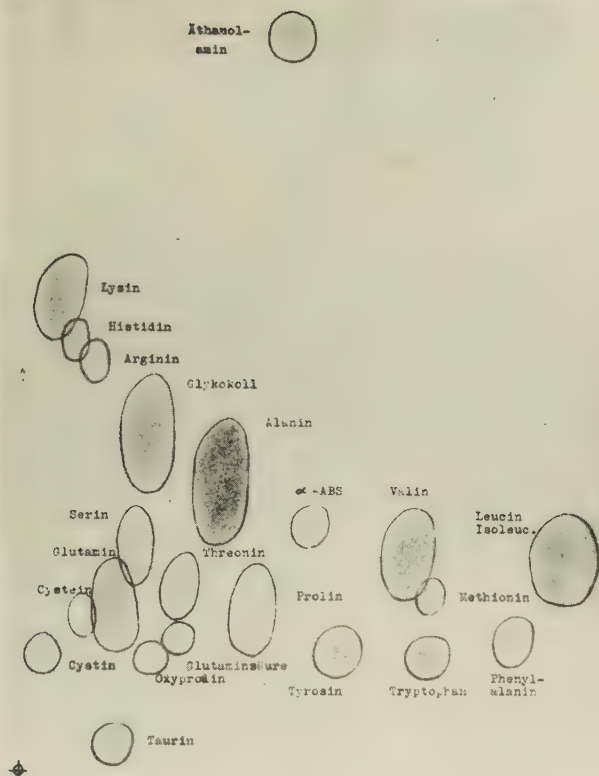


Abbildung 4: Kombiniertes zweidimensionales Elektrophero-Chromatogramm. Hochspannungselektrophorese 90 Min., 80 V/cm, p_H 1,9. Anschließend aufsteigende Papierchromatographie 20 Stunden in Butanol, Eisessig, Wasser 4:1:5, Färbung mit Ninhydrin. Man erkennt 22 verschiedene Flecken. Auf dem Originalchromatogramm waren einige weitere, schwächer gefärbte Flecken sichtbar.

◆ = Auftragsstelle

Tabelle 8: Gesamtmenge an freien α -Aminosäuren ($\mu\text{Mol/ml}$) in Pleura- und Ascitespunktionen bei verschiedenen Erkrankungen.

Patient	Aminosäure- menge	Spez. Gew. d. Punktes	Diagnose
Exsudate (Rivalta positiv)			
V. B.	3,57	1018	Pleuritis exs. bei Pneumonie
W. D.	3,45	1025	Ascites bei Peritonealcarci- nose (hämorrhagisch)
B. K.	4,65	1016	Pleuritis exsudativa
	2,09	1017	
C. K.	4,23	1022	Pleuritis exs. bei Pneumonie
	4,61	1023	
K. K.	3,80	1022	Pleuritis exs. bei Pneumonie
E. R.	2,20	1024	Pleuritis exs. tuberculosa
J. T.	3,12	1020	Pleuritis exs. bei Pneumonie
Transsudate (Rivalta negativ)			
K. G.	2,10	1010	Ascites bei Lebercirrhose
E. K.	4,97	1010	Pleuraerguß bei Einflußstauung infolge Mediastinaltumors
K. R.	5,84	1005	Ascites bei Lebercirrhose
G. S.	5,04	1003	Pleuraerguß bei Erythematodes
	3,33	1005	mit Lebercirrhose, Glomerulo- nephritis und Herzinsuffizienz
	3,87	1004	
	4,72	1002	
	4,93	1003	
	8,38	1005	Ascites beim gleichen Fall
	4,31	1006	
N. S.	5,67	1007	Pleuraerguß bei Herzinsuffiz.
P. W.	3,00	1005	Pleuraerguß bei Herzinsuffiz. (Aortenstenose)
	2,79	1006	
	3,10	1005	

b) Einzelaminosäuren

Auf kombinierten Elektrophero-Chromatogrammen (vgl. Abbildung 4) konnten wir bis 31 verschiedene ninhydrinpositive Substanzen gleichzeitig nachweisen. Davon wurden 26 Flecken identifiziert. Bei den restlichen unbekannten Substanzen (auf den Chromatogrammen mit $x_1 - x_5$ bezeichnet) handelt es sich wahrscheinlich zum Teil um niedere Peptide. Nach Salzsäurehydrolyse verschwinden sie. 18 Substanzen fanden sich regelmäßig, 25 in über 50 % der untersuchten Fälle. Tab. 9 gibt einen Überblick über die Häufigkeit, mit der die verschiedenen Substanzen nachgewiesen wurden.

Die deutlichsten Flecken wurden stets durch Alanin, Glykokoll und Glutamin hervorgerufen, dann folgten die Leucine und in weiterem Abstand Valin, Prolin, Lysin, Serin und Threonin. Die übrigen Flecken sind etwas schwächer. Beim Blutplasma ordnen sich die Fleckendichte und -größe der einzelnen Aminosäuren etwa in der gleichen Reihenfolge (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10). Auch bei der qualitativen Bestimmung der Einzelaminosäuren ergaben sich keine Unterschiede zwischen Ascites- und Pleurapunktaten und keine Korrelationen zum Eiweißgehalt oder spezifischen Gewicht der Flüssigkeiten.

Außer diesen qualitativen Untersuchungen wurden in einigen Fällen die Einzelaminosäuren nach Trennung an der Ionenaustauschersäule auch quantitativ bestimmt. Abbildung 5 zeigt die automatisch registrierte Extinktionskurve eines solchen Chromatogramms (Fall G. S. der Tabelle 8, Ste. 38, Gesamt- α -Amino-N 3,87 μ Mol/ml, leichte Rest-N-Erhöhung im Blut). Man erkennt 30 verschiedene, klar getrennte Gipfel. Davon wurden 4 Gipfel ($y_1 - y_4$) durch unbekannte Substanzen hervorgerufen. Die obere Kurve wurde beim Extinktionsmaximum von Prolin und Oxyprolin geschrieben. Diese beiden Aminosäuren kommen also hier besser zur Darstellung. Die untere Kurve wurde beim Extinktionsmaximum der anderen Aminosäuren aufgenommen. War deren Konzentration so hoch, daß die Kurve außer Meßbereich geriet, wurde zur Auswertung auch hier die obere Kurve benutzt. Tabelle 9 gibt die Aminosäuremengen in μ gr/ml an.

Serin und Glutamin konnten bei dem geschilderten Vorgehen nicht getrennt werden. Versuche mit anderen Pufferlösungen, die eine einwandfreie Trennung gestatten, unterblieben. Der Glutaminwert ist an sich nur mit Vorsicht zu verwerten, da eine gewisse Menge dieser Aminosäure am Austauscher zerstört wird. In Versuchen mit Reinsubstanzen wurde ein Verlust von mindestens 5 - 10 % ermittelt, wechselnd, je nach Versuchsbedingungen.

Äthanolamin	23	1,22
Ala	23	58,89
$\propto$ ABS	23	2,37
β , γ ABS	9	n.best.
Arg	18	11,50
Asp.	3	4,79
Cystein	14	0,09
Cysteinsre	7	3,72
Cystin	23	4,56
Glu	23	17,95
Glu - NH ₂	23	(38,24)
Gly	23	44,74
His	23	21,10
Lei	23	13,64
Ileu	23	18,10
Lys	23	31,87
Met	8	9,85
Orn	12	5,55
Phe	23	15,53
Oxypro	12	3,15
Pro	23	34,54
Ser	23	(5,68)
Taurin	23	3,13
Thr	23	8,46
Tyr.	23	18,66
Try	23	n.best.
Val	23	24,95
x ₁	18	
x ₂	19	
x ₃	12	
x ₄	10	
x ₅	9	

Tabelle 9: Freie Aminosäuren in Ascites- und Pleurapunktaten.

Spalte 1: Häufigkeit ihres qualitativen Nachweises auf kombinierten Elektrophore-Chromatogrammen bei 23 Punktaten.

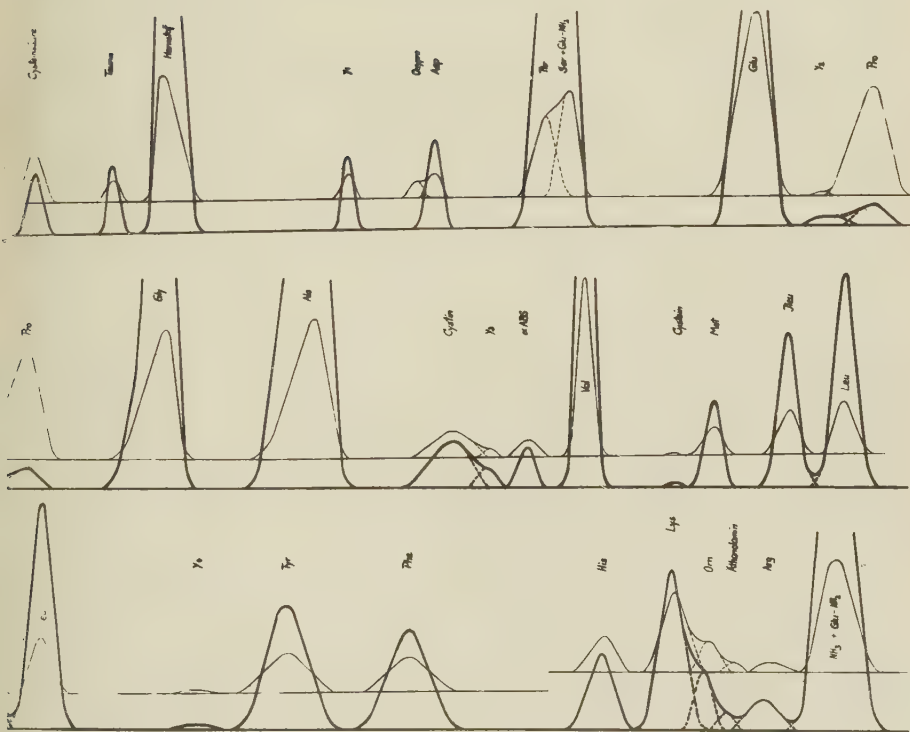
Spalte 2: Quantitative Aminosäurewerte (Fall G. S.) in $\mu\text{gr/ml}$, bestimmt nach Trennung an Ionenaustauschersäulen.

Die in Klammern angegebenen Werte sind Näherungswerte.

ABS = Aminobuttersäure.

x₁ usw. = nicht identifizierte Substanzen.

Abbildung 5: Automatisch geschriebene Extinktionskurve der Aminosäuren eines Pleurapunktates nach Trennung an der Ionenaustauschersäule und Färbung mit Ninhydrin. Die obere Kurve wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 436 \text{ m}\mu$, die untere Kurve bei der Wellenlänge $\lambda = 578 \text{ m}\mu$ geschrieben. (Aminosäure-Trennungsgapparat von Bender & Hobein, München, mit Elphor-Integrator, mit Durchlaufküvette ausgerüstet)



5. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit können wir die erste systematische Untersuchung über den Gehalt an freien Aminosäuren in Ascites- und Pleurapunktaten vorlegen.

Wir haben 25 Substanzen in über 50 % der untersuchten Fälle qualitativ nachgewiesen. Daß uns dies nicht regelmäßig glückte, mag mit daran liegen, daß zur Erzielung guter Trennung nur sehr geringe Flüssigkeitsmengen zur Chromatographie verwendet wurden und wir auf Spezialfärbungen für Substanzen, die sich mit Ninhydrin schlecht färben, verzichteten. Sicher gelangen alle sonst im Blutserum vorhandenen niedermolekularen Substanzen auch in die Ergußflüssigkeiten und lassen sich dort nachweisen.

Die beiden im Blutplasma stets vorhandenen Aminosäuren Ornithin und Methionin wurden in den Ergüssen in vielen Fällen vermißt. Der Ornithingehalt ist auch im Plasma gering (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10). Der fehlende Methioninnachweis mag darauf beruhen, daß diese Aminosäure sich auf Papierchromatogrammen mit Ninhydrin weniger gut anfärbt und Spezialfärbungen unterblieben. Bei der in einigen Fällen durchgeführten quantitativen Bestimmung an der Ionenaustauschersäule war sowohl Ornithin wie Methionin nachweisbar, letzteres sogar in beachtlicher Konzentration.

In 12 von 23 Fällen fanden wir einen Flecken, der bei der Untersuchung in mehreren verschiedenen Laufmitteln der Position des Oxyprolins entsprach und sich ähnlich färbte wie diese Aminosäure. Auch bei der Ionenaustauscherchromatographie war ein deutlicher Oxyprolingipfel erkennbar. Wir haben daher keinen Zweifel an dem Vorkommen dieser Aminosäure in Pleurapunktaten. Dies ist bemerkenswert, denn in Chromatogrammen von Blutserum war Oxyprolin nicht nachweisbar (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10).

Asparaginsäure konnten wir nur in 3 Elektrophero-Chromatogrammen auffinden, obwohl ihre Konzentration bei der Austauscherchromatographie mit 4,79 µgr/ml bestimmt wurde. Wahrscheinlich ist die oft mangelhafte Trennung von dem sehr kräftigen Glutaminfleck dafür verantwortlich, daß wir sie auf den Elektrophero-Chromatogrammen so selten eindeutig identifizieren konnten. β -Aminobuttersäure, γ -Aminobuttersäure und β -Aminoisobuttersäure können mit dieser Technik ebenfalls nicht voneinander getrennt werden. Bei der Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 x 8 erscheinen ihre Gipfel so spät, daß wir auch hier auf ihre Bestimmung verzichten mußten. Wir können daher nicht sagen, ob der auf unseren Elektrophero-Chromatogrammen in der Position der γ -ABS gefundene Fleck einheitlich ist oder nicht. Ebenso kann im Histidinleck noch eine geringe Menge Methylhistidin enthalten sein. Bei der Säulenchromatographie erhielten wir jedoch in der Position dieser Substanz keinen eigenen Gipfel. Regelmäßig entdeckten wir in geringen Spuren Äthanolamin, das im Liquor cerebrosplanis

(KNAUFF und ZICKGRAF, 102) und vor allem im Harn (WALSHE, 13, diese Arbeit, Teil II) oft reichlich vorkommt. Bei der Cysteinsäure dürfte es sich um ein in-vitro-Oxydationsprodukt von Cystein handeln.

Unterschiede zwischen Exsudaten und Transsudaten oder zwischen Ascites- und Pleurapunktaten fanden wir nicht. KELLER (89) stellte das Gleiche für Rest-N und Harnsäure, GREENE, BOLLMANN, KEITH und WAKEFIELD (84) und BALINT und BENKÖ (85) für anorganische Ionen fest. Es besteht also hier ein wesentlicher Unterschied zu den Eiweißkörpern (KELLER, 89, WINTER und TRAUB, 91, FELDER, 92, WUNDERLY und WUHRMANN, 93, TRAUB, 94, FUCHS, 95, VANNINI und IPPOLITO, 96, SCHWARTZKOPFF und MEISSNER, 102). Die freien Aminosäuren scheinen als niedermolekulare Substanzen in jedem Fall passiv aus dem Blutplasma und der Gewebslymphe in die Ergüsse hineinzudiffundieren. Dafür spricht auch, daß das Aminosäurespektrum und die Konzentration von Gesamtaminostickstoff und Einzelaminosäuren der Ergüsse mit den vom Serum bekannten Werten (HIER und BERGEIM, 77, SCHREIER und PLÜCKTHUN, 7, HOFSTATTER, ACKERMANN und KOUNTZ, 8, JOHNSON und BERGEIM, 78, STEIN und MOORE, 9, McMENAMY, LUND und ONCLEY, 79, KELLEY und WAISMAN, 80, MÜTING, 47, KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10, RUBINSTEIN und PRYCE, 31) übereinstimmen. Bei Körperflüssigkeiten mit besonderem Sekretionsmechanismus wie Schweiß (ITHOH und NAKAYAMA, 103) oder Harn (WALSHE, 13, STEELE, REYNOLDS und BAUMANN, 11, HARPER, HUTCHIN und KIMMEL, 104, KIRSNER, SHEFFNER und PALMER, 105, 106, CARSTEN, 107) oder bei solchen, die vom Blutserum durch eine besondere Schranke geschieden sind, wie Liquor cerebrospinalis (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF, 37, KNAUFF und ZICKGRAF, 101, RICHTER, DAWSON, REES, 108, SCHÖNENBERG, 63, BAUER und BOESCHE, 109), ist dies nicht der Fall. Die Ansicht von LICHTWITZ (83), daß die freien Aminosäuren in Ergüssen in erster Linie durch proteolytische Enzyme der Leukocyten aus Eiweißen freigesetzt würden und daher in Transsudaten und rein lymphocytären, z. B. tuberkulösen, Exsudaten fehlten, findet in unseren Ergebnissen ebenfalls keine Stütze.

Die Schwankungsbreite der Gesamtaminosäurekonzentration zwischen verschiedenen Punktaten ist wesentlich größer als die individuelle Streuung der Aminosäurekonzentration des Blutplasmas (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10). Zum Teil beruht dies sicher darauf, daß es sich hier um pathologische Fälle mit verschiedensten Leiden handelt, während von KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF (10) nur Nüchternplasmen gesunder Versuchspersonen untersucht wurden. Die Zahl unserer Fälle ist zu klein und unser Patientenmaterial zu unterschiedlich, um Korrelationen zu bestimmten Krankheiten aufzustellen, aus denen diagnostische Schlüsse gezogen werden könnten. Die vorliegenden Untersuchungen lassen dies auch nicht sehr lohnend erscheinen. Jedoch wäre die simultane Untersuchung von Blutserum und Er-

gußflüssigkeit beim selben Patienten wünschenswert, wie sie für Eiweißkörper (KELLER, 89, WINTER und TRAUB, 91, FELDER, 92, WUNDERLY und WUHRMANN, 93, TRAUB, 94, FUCHS, 95, VANINI und IPPOLITO, 96), Rest-N (KELLER, 89), Elektrolyte (GREENE, BOLMANN, KEITH und WAKEFIELD, 84, BALINT und BENKÖ, 85, KELLER, 90), Glucose (GELENGER und WIGGERS, 86, ENGELBACH, 87, CALNAN, WINFIELD und CROWLEY, 88, KELLER, 90), Bilirubin (KELLER, 90) und radioaktives Phosphat (DAL SANTO und CAMPUS, 110) bereits von anderer Seite durchgeführt wurde.

Bei den Einzelaminosäuren ergaben sich ebenfalls stärkere individuelle Unterschiede, vor allem bei Lysin, Prolin, Threonin, Serin und Histidin. Jedoch sind auch beim Blutplasma erheblichere, über die Streubreite des Gesamtaminostickstoffs hinausgehende physiologische Schwankungen einzelner Aminosäuren bekannt (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 10).

ZUSAMMENFASSUNG

- I.
 1. Reaktionsbedingungen, Spezifität, Fehlermöglichkeiten und Schwankungsbreite einer neuen, von CHAPELLE und LUCK beschriebenen, gasometrischen Bestimmungsmethode für Aminosäuren wurden durch Versuche mit Reinsubstanzen und mit Harn überprüft.
 2. Die Decarboxylierungsreaktion mit N-Bromsuccinimid läuft bei verschiedenen Aminosäuren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Gewisse Ketosäuren geben die gleiche Reaktion, sind jedoch auf einfache Weise entfernbar.
 3. Die Vorteile des Verfahrens für die Harnaminosäureuntersuchung im Vergleich zu bisherigen Methoden werden diskutiert. Sie liegen in seiner Einfachheit, Genauigkeit und Spezifität.
 4. Die erhaltenen Aminosäurewerte für Normalharn bei Mensch und Ratte liegen im Bereich der Literaturwerte. Bei der experimentellen Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Ratte und bei drei Fällen von Morbus Wilson wurden deutliche Aminoacidurien beobachtet.
- II.
 1. Die Ausscheidung von freien Aminosäuren im Harn wurde bei Gesunden und Leberkranken mit Hilfe eines kombinierten hochspannungselektrophoretisch-papierchromatographischen Verfahrens untersucht.
 2. Bei gesunden Versuchspersonen wurden 20 ninhydrinpositive Substanzen regelmäßig gefunden. Bei einem Teil konnten dazu noch weitere Aminosäuren nachgewiesen werden.

3. Bei Hepatitis epidemica ist die Menge des ausgeschiedenen Gesamt- α -Aminostickstoffes nicht vermehrt. Bei schweren Krankheitsbildern zu Beginn der Erkrankung kann es jedoch zu einer relativen Vermehrung vor allem der cyklischen Aminosäuren, des Cystins, manchmal auch der Leucine und des Valins kommen, die zu Verschiebungen im Aminosäurespektrum gegenüber dem Normalfall führt. Eine Parallelität zum Ausfall der Serumlabilitätsreaktionen wurde nicht festgestellt.
4. Bei schweren, dekompensierten Lebercirrhosen wird meist ebenfalls eine vermehrte Ausscheidung der cyklischen Aminosäuren, des Valins, Äthanolamins und des Taurins beobachtet. Der Gesamt- α -Aminostickstoff ist auch hier nicht signifikant vermehrt. Bei kompensierten Lebercirrhosen sind keinerlei Veränderungen nachweisbar.
5. Die Unterschiede zwischen Hepatitisfällen und Lebercirrhosen sind zu wenig ausgeprägt, um daraus diagnostische Schlüsse zu ziehen.

- III.
1. In 23 Ascites- und Pleurapunktaten wurden 32 verschiedene ninhydrin-positive Substanzen nachgewiesen. 19 Aminosäuren konnten regelmäßig, 4 weitere in über 50 % der Fälle aufgefunden werden. Der Gesamtamino-säuregehalt wurde quantitativ bestimmt, bei einigen Punktatflüssigkeiten auch die meisten Einzelamino-säuren nach Trennung an der Ionen-austauschersäule.
 2. Das Aminosäurespektrum und die Konzentration von Gesamt- α -Amino-stickstoff und Einzelamino-säuren der Punktatflüssigkeiten stimmen mit dem vom Blutplasma bekannten Werten überein.
 3. Zwischen Exsudaten und Transsudaten wurden keine Unterschiede gefunden. Auch Ascites- und Pleurapunktate verhalten sich gleich.
 4. Die Ergebnisse sprechen für passive Diffusion der Aminosäuren in die Ergußflüssigkeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Sørensen, S. P. L.: Über die Ausführung der Formoltitration in stark farbigen Flüssigkeiten.
Biochem. Z. 7, 407, 1907
2. Sørensen, S. P. L.: Compt.-rend. trav. Carlsberg 7, 1, 1907
3. Folin, O.: A new colorimetric method for the determination of the amino acid nitrogen in blood.
J. biol. Chem. 51, 377, 1922
4. Folin, O.: A colorimetric determination of the amino acid nitrogen in normal urine.
J. biol. Chem. 51, 393, 1922
5. Troll, W. und Cannan, R. K.: A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and amino acids.
J. biol. Chem. 200, 803, 1953
6. Moore, S. und Stein, W. H.: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds.
J. biol. Chem. 211, 907, 1954
7. Schreier, K. und Plückthun, H.: Untersuchungen über den Gehalt an freien Aminosäuren im Serum und Urin.
Biochem. Z. 320, 447, 1950
8. Hofstatter, L., Ackermann, P. G. und Kountz, W. B.: The plasma levels of nine free amino acids in old men and women.
J. Lab. clin. Med. 36, 259, 1950
9. Stein, W. H. und Moore, S.: The free amino acids of human blood plasma.
J. biol. Chem. 211, 915, 1954
10. Knauff, H. G., Dieterle, P. und Zickgraf, H.: Quantitative Bestimmung von 21 freien Plasma-Aminosäuren bei gesunden Versuchspersonen.
Hoppe-Seyler's Z. f. phys. Chem. 316, 186, 1959

11. Steele, B. F., Reynolds, M. S. und Baumann, C. A.:
Amino acids in the blood and urine of human subjects
ingesting different amounts of the same proteins.
Nutrition 40, 145, 1950
12. Dent, C. E.: Proc. First Internat. Congress of Clinical Pathology ed.
S. C. Dyke 2nd ed. London
13. Walshe, J. M.: Disturbances of amino acid metabolism
following liver injury.
Quart. J. Med. 88, 483, 1953
14. Dent, C. E. und Walshe, J. M.:
Amino acid metabolism.
Brit. Med. Bull. 10, 247 1954
15. Werle, E.: "Niere und Harn", in Flaschenträger- Lehnartz
Phys. Chemie, Ein Hand- und Lehrbuch,
Bd. II 2 b, S. 42 ff. und 134 ff.
16. Lang, K. und Ranke, O. F.:
Stoffwechsel und Ernährung, S. 146
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1950
17. Van Slyke, D. D., Dillon, R. T., MacFadyen D. A. und Hamilton, P.:
Gasometric determination of carboxyl groups in the
free amino acids.
J. biol. Chem. 141, 627, 1941
18. Hamilton, P. B. und van Slyke, D. D.:
The determination of free amino acids in blood fil-
trates by the ninhydrin-carbon dioxide method.,
J. biol. Chem. 150, 231, 1943
19. Van Slyke, D. D., MacFadyen, D. A. und Hamilton, P.:
The gasometric determination of amino acids in urine
by the ninhydrin-carbon dioxide method.
J. biol. Chem. 150, 251, 1943
20. Chappelle, W. und Luck, J. M.:
The decarboxylation of amino acids, proteins, and
peptides by N-Bromsuccinimide.
J. biol. Chem. 229, 171, 1957

21. Barakat, M. Z. und Mousa, G. M.:
The action of N-Bromsuccinimide on alcohols and
amins.
J. Pharm. Pharmacol. 4, 115, 1952
22. Barakat, M. Z.: A note on the action of N-Bromsuccinimide on
aliphatic dicarboxylic acids.
J. Pharm. Pharmacol. 4, 582, 1952
23. Barakat, M. Z., El-Wahab, M. F. A. und El-Sadr, M. M.:
J. Am. Chem. Soc. 77, 1670, 1955, cit. Chapelle.
24. Leonardi, G. und Glasenapp, I.:
Nachweis und Bestimmung der Acetessigsäure
im Harn.
Hoppe-Seyler's Z. f. phys. Chem. 286, 145, 1950
25. Prager, B. und Jacobson, P.:
Acetessigsäure. In Beilsteins Handbuch der Org.
Chemie, Bd. III, S. 630,
Springer-Verlag, Berlin, 4. Aufl., 1921
26. Van Slyke, D. D., MacFadyen, D. A. und Hamilton, P.:
Determination of free amino acids by titration on
the carbon dioxide formed in the reaktion with
ninhydrine.
J. biol. Chem. 141, 671, 1941
27. Albanese, A. A. und Iry, V.:
Determination of urinary amino nitrogen by the
copper method.
J. biol. Chem. 153, 583, 1944
28. Eckhardt, R. D. und Davidson, C. S.:
Urinary Excretion of amino acids by a normal adult
receiding diets of varied protein content.
J. biol. Chem. 177, 687, 1949
29. Stein, W. H.: A chromatographic investigation of the amino
acid constituents of normal urine.
J. biol. Chem. 201, 45, 1953
30. Mütting, D.: Der Aminosäuregehalt des menschlichen Urins.
Hoppe-Seyler's Z. f. phys. Chem. 297, 61, 1954

31. Rubinstein, H. M. und Pryce, J. D.:
The colorimetric estimation of alpha-amino nitrogen
in tissue fluids.
J. clin. Path. 12, 80, 1959
32. Siemerling, E. und Oloff, H.:
Pseudosklerose (Westphal-Strümpel) mit Cornealring
(Kayser-Fleischer) und doppelseitigem Scherenkatarakt,
die nur bei seitlicher Beleuchtung sichtbar ist und die
nach der Verletzung durch Kupfersplitter entstehenden
Katarakten ähnlich ist.
Klin. Wochenschr. 1, 1087, 1922
33. Uzman, L. und Denny-Brown, D.:
Amino-Aciduria in hepatolenticular
Degeneration (Wilson Disease).
J. Am. Med. Soc. 215, 599, 1948
34. Moore, S. und Stein, W. H.:
Amino-Aciduria in Wilsons Disease.
Proc. II Internat. Congress of Biochemistry
Paris 1952, p. 367
35. Stein, W. H., Bearn, A. G. und Moore, S.:
The amino acid content of the blood and urine in
Wilson's Disease.
J. clin. Invest. 33, 10, 1954
36. Steger, J. und Steger, R.:
Die Störungen des Kupfer- und Aminosäurestoff-
wechsels bei der hepatocerebralen Degeneration und
deren Behandlung mit BAL.
Dt. Z. f. Nervenheilkunde 172, 321, 1954
37. Knauff, H. G., Mialkowski, W. und Zickgraf, H.:
Über die freien Aminosäuren des Liquor cerebrospinalis
und ihren Nachweis mit kombinierten papierchromato-
graphischen und elektropherographischen Methoden.
Z. f. klin. Med. 155, 483, 1959
38. Smetana, H.:
Carbon Tetrachloride.
Arch. Int. Med. 63, 760, 1939

39. Corcoran, A. L., Taylor und Irvine:
Carbon Tetrachloride.
J. A. M. A. 123, 81, 1943
40. Forbes, J. R.: Carbon Tetrachloride.
Lancet 247, 590, 1944
41. Hoffman, J., Himes, M. B., Lazan, S. Riszki, R. und Post, J.:
Responses of the liver to injury: Effects of acute
carbon tetrachloride poisoning.
A. M. A. Arch. Path. 59, 429, 1955
42. Berger, H. und Antener, I.:
Der Einfluß des Eiweißgehaltes der Nahrung auf die
Ausscheidung von freiem Alpha-Amino-Stickstoff im
Harn als Maß der Aminoacidurie.
Int. Z. f. Vitaminforsch. 28, 17, 1959
43. Schreier, K. und Sattelberg, H.:
Untersuchungen über den Aminosäurestoffwechsel bei
Erkrankungen der Leber.
Dt. Med. Wschr. 866, 1951
44. Cachin, M., Durlach, J. und Blass, J.:
Les acides aminés du serum sanguin en pathologie
hépatique.
Semaine Hôp. 3231, 1952
45. Walshe, J. M. und Senior, B.:
Disturbances of Cystin Metabolism in liver disease.
J. clin. Invest. 34, 302, 1955
46. Bichel, H. und Souchon, F.:
Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde.
31, Beiheft Arch. Kinderheilk. 1955
47. Müting, D.: Der Aminosäurehaushalt des Menschen.
Arzneimittelforsch. 8. Beiheft 1955
48. Wewalka, F.: Beziehungen zwischen Störungen des Aminosäure-
stoffwechsels und Leberkrankheiten.
Act. hepatolog. 4, 137, 1956

49. Iber, F. L., Rosen, H., Levenson, S. M. und Chalmers, T. C.:
The plasma amino acids in patients with liver failure.
J. Lab. and clin. Med. 50, 417, 1957
50. Frankl, Martin und Dunn:
Arch. Biochem. 13, 103, 1947; cit. Walshe.
51. Mann, F. C.: The effects of complete and of partial removal
of the liver.
Medicine 6, 419, 1927
52. De Vries, A. und Alexander, B.:
Studies on amino acid metabolism.
II. Blood glycerine and total amino acids in various
pathological conditions, with observations on the
effect of intravenously administered glycerine.
J. clin. Invest. 27, 655, 1948
53. Dent, C. E.: Biochem. Soc. Symp. No. 3, Cambridge 1950
54. Dent, C. E.: Der Aminosäurestoffwechsel.
Schw. Med. Wochenschr. 80, 752, 1950
55. Dent, C. E., Walshe, J. M., Sherlock, S. und Wolstenholm, G. E. W.:
Ciba Foundation Symposium on Liver Disease S. 22,
ed. Churchill, London 1951
56. Yi-Yung Hsin, D. und Gillis, S. S.:
Amino acid metabolism in infectious hepatitis.
J. clin. Invest. 33, 1603, 1954
57. Consden, R., Gordon, A. H. und Martin, A. J.:
The identification of lower peptides in complex
mixtures.
Biochim. J. 41, 590, 1947
58. Astrup, T., Stage, A. und Olsen, E.:
A desalting apparatus for amino acids.
Acta chem. scand. (Kopenh.) 5, 1343, 1951
59. Kickhöfen, B. und Westphal, O.:
Trennung der Aminosäuren- und Peptidgemische durch
Hochspannungs-Papierionophorese.
Z. Naturforsch. 7 b, 655, 1953

60. Levy, A. L. und Chung, D.:
Two-dimensional chromatography of amino acids on buffer paper.
Analyt. Chem. 25, 396, 1953
61. Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
1954, S. 89
62. Kawerau, E. und Wieland, Th.:
Conservation of amino acids chromatograms.
Nature 168, 77, 1951
63. Schönenberg, H.: Kritische Bemerkungen zur klinischen Papierchromatographie der Aminosäuren.
Klin. Wochenschr. 34, 9/10, 1956
64. Van den Bergh, H.: Abbau des Hämoglobins.
Wien. Med. Wochenschr. 81, 1359, 1931
65. Takata, M.: Über eine neue kolloidchemische Liquorreaktion etc.
Tokyo 1926 (Sonderheft)
66. Mancke, R. und Sommer, J.:
Die abgestufte Takata-Reaktion im Serum zur Diagnose von Leberkrankheiten.
Münch. Med. Wochenschr. 83, 1707, 1936
67. MacLagan, N. F.: Thymol turbidity test: A new indicator of liver dysfunction.
Nature 154, 670, 1944
68. Weltmann, O.: Über die Spiegelung exsudativentzündlicher und fibröser Vorgänge im Blutserum.
Med. Klin. 26, 240, 1930
69. Decker, P., Riffart, W. und Wagner, H.:
Die papierchromatographische Bestimmung der Aminosäuren im Urin.
Klin. Wochenschr. 418, 1951
70. Honda, M.: Untersuchung des Harns gravider Frauen.
J. Biochem. (Japan) 2, 351, 1923

71. Walraff, E. B., Brodie, E. C. und Borden, A. L.:
Urinary excretion of amino-acids in pregnancy.
J. clin. Invest. 29, 1542, 1950
72. Sheft, B. B. und Oldham, H.:
Amino-acid intakes and excretions during pregnancy.
J. Am. Diet. Ass. 28, 313, 1952
73. Miller, S., Ruttinger, V. und Macy, I. G.:
Urinary excretion of the amino-acids by women during
the reproductive cycle.
J. biol. Chem. 209, 795, 1954
74. Christensen, P. J., Date, J. W., Schönheyder, F. und Volquartz, K.:
Amino acids in blood plasma and urine during
pregnancy.
Scand. J. clin. Lab. Investig. 9, 54, 1957
75. Gabuzda, G. J., Eckhardt, R. D. und Davidson, C. S.:
Urinary excretion of amino acids in patients with
cirrhosis of the liver and in normal adults.
J. clin. Invest. 31, 1015, 1952
76. Dunn, M. S., Akawaie, S., Yeh, H. L. und Martin, H.:
Urinary excretion of amino-acids in liver disease.
J. clin. Invest. 29, 302, 1950
77. Hier, S. W. und Bergeim, O.:
The microbiological determination of certain free
amino acids in human and dog plasma.
J. biol. Chem. 163, 129, 1946
78. Johnson, C. A. und Bergeim, O.:
The distribution of free amino acid excretion in men.
I. Amino acids in urine. J. biol. Chem. 188, 833, 1951
79. McMenamy, R. H., Lund, C. C. und Oncley, J. L.:
Unbound amino acid concentrations in human blood
plasmas.
J. clin. Invest. 36, 1672, 1957
80. Kelley, J. J. und Waisman, H. A.:
Quantitative plasma amino acid values in leucemic
blood.
J. Haematol. 12, 635, 1957

81. Lustig, B. und Fürth, K.:
Zur Bestimmung der einzelnen stickstoffhaltigen Bestandteile im Blut und in serösen Flüssigkeiten auf dem Wege fraktionierter Sublimatfällung.
Biochem. Z. 215, 286, 1929
82. Reiche, F.: *Med. Klin.* 1933, I, 599
83. Lichtwitz, L.: *Klin. Chemie*, 2. Aufl. S. 630, Berlin 1930
84. Greene, C. H., Bollmann, J. L., Keith, N. M. und Wakefield, E. G.:
The distribution of electrolytes between serum and transsudates.
J. biol. Chem. 91, 203, 1931
85. Balint, P. und Benkö, G.:
Die Verteilung der Na- und Cl-Ionen zwischen Blutserum einerseits, Pleurapunktat, Ascites und Liquor cerebrospinalis andererseits.
Experientia 3, 458, 1947
86. Gelenger und Wiggers:
Dis. Chest. 3: 325, 1949; cit. K. Engelbach.
87. Engelbach, K.: Die Bewertung der Zuckerbestimmung in Pleurapunktaten für die Diagnose der Pleuritis exsudativa.
Tuberkulosearzt 4, 327, 1950
88. Calnan, W. L., Winfield, B. J. D. und Crowley, M. F.:
Diagnostic value of the glucose content of serous pleural effusions.
Brit. Med. J. 1951 I, 1239
89. Keller, C.: Untersuchungen zur klinischen Chemie der Pleurahöhlenergüsse. I. Mitt.: Elektrophorese, N-Fractionen, Labilitätsproben.
Dt. Arch. klin. Med. 201, 136, 1954
90. Keller, C.: Untersuchungen zur klinischen Chemie der Pleurahöhlenergüsse. II. Mitt.: Elektrolyte, Glukose, Bilirubin.
Dt. Arch. klin. Med. 201, 539, 1954

91. Winter, H. und Traub, R.:
Ergebnisse und Bewertung eines Vergleichs der
Weltmann'schen Hitzekoagulation im Serum mit
der Koagulation in Punktaten.
Wien. klin. Wochenschr. 62, 917, 1950
92. Felder, O.:
Über die Möglichkeit einer elektrophoretischen
Differenzierung der Pleuraexsudate. Zugleich ein
Beitrag zur Frage der Eiweißsubstitutionsbehandlung.
Münch. Med. Wochenschr. 95, 928, 1953
93. Wunderly, Ch. und Wuhrmann, F.:
Plasma I, 27, 1953; cit. Fuchs
94. Traub, R.:
Zur Pathogenese und Differentialdiagnose von
Höhlenergüssen (Weltmann-Reaktion in Punktaten).
Wien. klin. Wochenschr. 1953, 322
95. Fuchs, G.:
Elektrophoretische Untersuchungen zur Exsudatbildung
in serösen Höhlen.
Klin. Wochenschr. 1956, 1231
96. Vannini, P. und Ippolito, A.:
Studio elettroforetico dei versamenti cavitari.
Nota II: Exsudati.
Arch. Pat. e Clin. med. 33, 113, 1956
97. Moore, S. und Stein, W. H.:
Chromatography of amino acids on sulfonated
polysterene resins.
J. biol. Chem. 192, 663, 1951
98. Moore, S., Spackman, D. H. und Stein, W. H.:
Chromatography of amino acids on sulfonated
polystyrene resins.
Analyt. Chem. 30, 1185, 1958
99. Spackman, D. H., Stein, W. H. und Moore, S.:
Automatic recording apparatus for use in the
chromatography of amino acids.
Analyt. Chem. 30, 1190, 1958
100. Hannig, K.:
Erfahrungen mit der quantitativen Aminosäurebestimmung
an Ionenaustauschersäulen und automatischen Regi-
strierung der Ergebnisse.
Clin. Chim. Acta 4, 51, 1959

101. Knauff, H. G. und Zickgraf, H.:
Über das Vorkommen von freiem Äthanolamin
(Colamin) im Liquor cerebrospinalis des Menschen.
Hoppe-Seylers Z. f. phys. Chem. 312, 264, 1958
102. Schwartzkopff, W. und Meissner, G.:
Über die Austauschvorgänge zwischen Pleurahöhle und
Blutbahn bei Trans- und Exsudaten.
Z. klin. Med. 154, 418, 1957
103. Itoh, S. und Nakayama, T.:
Amino acids in human sweat.
Jap. J. Phys. 2, 248, 1952
104. Harper, H. A., Hutchin, M. E. und Kimmel, J. R.:
Concentrations of nineteen amino acids in plasma
and urine of fasting normal males.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 80, 768, 1953
105. Kirsner, J. B., Sheffner, A. L. und Palmer, W. L.:
Studies on amino acid excretion in man.
III. Amino acid levels in plasma and urine of normal
men fed diets of varying protein content.
J. clin. Invest. 28, 716, 1949
106. Kirsner, J. B., Sheffner, A. L. und Palmer, W. L.:
Studies on amino acid excretion in man.
I. Amino acids in urine.
J. biol. Chem. 175, 107, 1948
107. Carsten, M. E.: A procedure for the ion exchange chromatography
of the amino acids of urine.
J. Am. Chem. Soc. 74, 5954, 1952
108. Richter, D., Dawson, R. M. C. und Rees, L.:
A note of the ammonium and glutamine content of
the cerebrospinal fluid.
J. Ment. Sci. 95, 148, 1949
109. Bauer, H. und Boesche, P.:
Die freien Aminosäuren des Liquors bei der multiplen
Sklerose. Klin. Wochenschr. 35, 511, 1957
110. Dal Santo, G. und Campus, S.:
The rate of penetration of labelled phosphate from
the plasma into pathological fluids.
Act. med. scand. (Stockh.) 154, 317, 1956

Es sei mir erlaubt, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. ZICKGRAF für die Übernahme der Arbeit herzlich zu danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. H. G. KNAUFF, der mich mit der Problemstellung betraute und mir zu jeder Zeit mit Rat und tatkräftiger Hilfe zur Seite stand.

L E B E N S L A U F

Am 27. April 1936 wurde ich, Hans SELMAIR, als Sohn des Facharztes für Innere Medizin und Besitzers des Sanatoriums Wartenberg Dr. med. Hans Selmair und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Schmitz-Rönsberg, in Wartenberg/Oberbayern geboren.

Meine Volksschulzeit verbrachte ich von 1942 bis 1946 in Wartenberg. 1946 wurde ich an das Progymnasium mit Internat der Benediktinerabtei Schäftlarn aufgenommen, wo ich bis 1952 blieb. Von 1952 an besuchte ich das Gymnasium des Benediktinerklosters Ettal, das ich im Juli 1954 nach Ablegung der Reifeprüfung verließ.

Im Wintersemester 1954/55 immatrikulierte ich mich als Student der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, wo ich ohne Unterbrechung studierte. Im Februar 1957 legte ich die ärztliche Vorprüfung mit Note I = sehr gut, im Frühjahr 1960 das Staatsexamen mit Note I ab.

